

**Untersuchungen
zum Mechanismus der Translokation
der DNA-abhängigen RNA-Polymerase
aus Escherichia coli**

Willi Metzger

Disbui. München

1988

**Untersuchungen zum Mechanismus
der Translokation der DNA-abhängigen
RNA-Polymerase aus *Escherichia coli***

Dissertation der Fakultät für Chemie und Pharmazie der
Ludwig-Maximilians-Universität München

von Willi Metzger aus München

München, 1988

1. Berichterstatter: Prof. W. Zillig
2. Berichterstatter: Prof. G. Hartmann

Tag der mündlichen Prüfung: 2. 12. 1988

Die vorliegende Arbeit wurde von Juli 1984 bis August 1988 unter der Anleitung von Dr. Hermann Heumann am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, in der Abteilung von Prof. W. Zillig durchgeführt.

Ich danke besonders Herrn Dr. Heumann für die Anregung zu dieser Arbeit, sein großes Interesse und seine stetige Unterstützung.

Herrn Prof. Zillig danke ich für anregende Diskussionen und dafür, daß mir die Infrastruktur seiner Abteilung zur Verfügung stand.

Bei Evelyn Rumpf und Frau Gisela Baer möchte ich mich für ihre Hilfe bei der Durchführung der Versuche bedanken.

Bei Dr. Hermann Lederer, Dr. Wladislaw Werel, Dr. Miriam Ricchetti und Peter Schickor bedanke ich mich für wertvolle Diskussionen. Herrn Lederer danke ich besonders für seine Hilfe bei Fragen der Datenverarbeitung.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe sowie der Abteilung danke ich für das angenehme Arbeitsklima und ihre Hilfsbereitschaft.

Inhaltsverzeichnis:

I	Einleitung	1
II.	Material und Methoden	7
II.1.	Präparation von Coreenzym	7
II.2.	Präparation der σ -Untereinheit	7
II.3.	Rekonstitution von $E\sigma$ aus Coreenzym und σ	8
II.4.	Reinigung der DNA-Fragmente	8
II.4.1.	Reinigen des A1-Fragments	8
II.4.2.	Erzeugen der Mutationen	9
II.4.3.	Präparation und Reinigung der mutierten Sequenzen	11
II.4.4.	Endmarkierung von Fragmenten für "footprinting"-Experimente	11
II.5.	Präparation von ApUpC (mit ^{32}P markiert und unmarkiert)	12
II.6.	Ausbildung von binären und ternären Komplexen	13
II.6.1.	Untersuchungen zu intermediären Stadien von DNA - RNAP - (RNA)- Komplexen	13
II.6.2.	Ausbildung von Komplexen, die anschließend durch Exonuklease III-"footprinting"-Versuche untersucht werden sollten	14
II.7.	Abortiver Transkriptionsansatz zur Messung der Transkriptionsaktivität	15
II.8.	Exonuklease III-"footprinting"-Experimente	15
II.9.	Gel- Elektrophoresen	16
II.9.1.	Nicht-denaturierende Acrylamidgele	16
II.9.2.	Sequenzgele	17

II.9.3. SDS - Gele	17
II.10. Quantifizierung von Gelbanden	18
III Ergebnisse	19
III.1. Überlegungen zur experimentellen Untersuchung der Translokation	19
III.1.1. Erzeugung von definierten ternären Transkriptionsstadien	19
III.1.2. Charakterisierung definierter ternärer Transkriptionsstadien	20
III.2. Charakterisierung intermediärer Stadien der Transkription mittels nicht-denaturierender Acrylamidgele	21
III.2.1. Stöchiometrien und Einfluß von Heparin	22
III.2.1.1. Zugabe von steigenden Mengen Coreenzym zu einer konstanten Menge DNA-Fragment	22
III.2.1.2. Titration von Coreenzym-DNA - Komplex mit steigenden Mengen σ -Faktor	24
III.2.1.3. Stöchiometrie zwischen Holoenzym und A1-DNA - Fragment	26
III.2.2. Einfluß von Temperatur und Ionenstärke auf binäre Holoenzym-DNA-Komplexe	29
III.2.3. Bildung von ternären Komplexen als Vorversuch für die Erzeugung definierter Transkriptionsstadien	32
III.3. Versuche Transkriptionsstadien mit RNA-Produkten definierter Länge "einzufrieren"	35
III.3.1. Erzeugung von RNA-Produkten mit 12 bzw. 21 Nukleotiden Länge mit Hilfe von O-Methyl - Stopnukleotiden	38
III.3.2. Verwendung von mutierten Promotorsequenzen	39

III.4.	Einfluß von Exonuklease III und von Pyrophosphat auf die Stabilität ternärer Komplexe; Exonuklease III-"footprints"	43
III.4.1.	Einfluß von Exonuklease III auf die Produkte ternärer Komplexe	43
III.4.2.	Einfluß von Pyrophosphat auf ternäre Komplexe	46
III.4.3.	Exonuklease III-"footprinting"-Experimente	48
III.4.4.	Produktanalyse der Exonuklease III-verdauten Komplexe	60
III.4.5.	Vergleich der "footprints" eines Exo III-stabilen und eines Exonuklease III-labilen M III 24-Stadiums	62
IV	Diskussion	64
IV.1.	Charakterisierung intermediärer Transkriptionsstadien mit Hilfe von nicht-denaturierenden Acrylamidgelen	64
IV.2.	Erzeugung von Transkriptionsstadien mit RNA-Produkten definierter Länge	66
IV.3.	Einfluß von Exonuklease III auf ternäre Komplexe	67
IV.4.	Exonuklease III-"footprinting"-Experimente	69
V	Zusammenfassung	75
VI	Literatur	78

Liste der verwendeten Abkürzungen:

RNA:	Ribonukleinsäure
DNA:	Desoxyribonukleinsäure
RNAP:	DNA-abhängige RNA-Polymerase
E σ :	Holoenzym
ATP:	Adenosintriphosphat
CTP:	Cytidintriphosphat
GTP:	Guanosintriphosphat
UTP:	Uridintriphosphat
O-M - NTP:	3'-O-Methyl-Nukleosidtriphosphat
bp:	Basenpaare
CAP:	Katabolit-Aktivator-Protein
RNase:	Ribonuklease
EDTA:	Ethylendinitrilotetraessigsäure
DEAE:	Diethylaminoethyl
PEG:	Polyethylenglykol
AA:	Acrylamid
Bis:	N,N'-Methylenbisacrylamid
EtBr:	Ethidiumbromid
CIP:	Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm
Tris:	Tris(hydroxyethyl)aminomethan
FPLC:	Fast Protein Liquid Chromatography
HPLC:	High Pressure Liquid Chromatography

Bq: Becquerel

Ci: Curie

M I bis M V: mutierte A1-Sequenzen mit verschieden langen
Insertionen zwischen Pos. +11 und +12

A1 11, M I 16 usw: RNAP-DNA - Komplex ausgebildet mit A1-
Wildtypsequenz oder entsprechender
Mutation im dahinter angegebenen Raster



I Einleitung

Die Transkription ist der erste Schritt auf dem Weg von der genetischen Information, die in der DNA codiert ist, zu lebenden Strukturen. Das Prinzip der Transkription, einen Strang der DNA in basenkomplementäre RNA zu übersetzen, ist bei allen Lebewesen gleich, in den Details gibt es jedoch bedeutende Unterschiede zwischen eukaryontischer, eubakterieller und archaeobakterieller Transkription. Das relativ einfach organisierte und gut erforschte eubakterielle Transkriptionssystem hatte für *in vitro* Untersuchungen, wie sie in dieser Arbeit vorgestellt werden, wegen seiner begrenzten Zahl an Komponenten entscheidende Vorteile gegenüber dem komplexeren Transkriptionsapparat der Eukaryonten und dem der vergleichsweise noch wenig untersuchten Archaeobakterien.

Überblick über die eubakterielle Transkription

Bei *E. coli*, das als repräsentativ für die Eubakterien angesehen werden darf, transkribiert, im Gegensatz zu den Eukaryonten, nur eine DNA-abhängige RNA-Polymerase sämtliche Gene. Sie besteht aus den vier Untereinheiten: β' (155145 Da), β (150163 Da), α_2 (72978 Da) und σ (70213 Da). Der Komplex aus β' , β und der dimeren Untereinheit α_2 wird als Coreenzym bezeichnet. Erst durch die Bindung des Initiationsfaktors σ ist Coreenzym in der Lage, die Transkription spezifisch an den Promotoren zu initiieren. Bei *E. coli* gibt es mehrere unterschiedliche σ -Faktoren. Neben σ^{70} , das für die Erkennung der Mehrzahl der Promotoren verantwortlich ist, sind noch σ^{32} (für die Erkennung von Hitzeschockpromotoren) und σ^{60} (für die Erkennung der *nif*-Gene zur Stickstofffixierung) bekannt.

Die Transkription läßt sich, entsprechend ihrem zeitlichen und funktionellen Ablauf, in mehrere Abschnitte gliedern.

1.) Bindung der RNA-Polymerase an den Promotor:

Die RNA-Polymerase muß zunächst aus einer Vielzahl von unspezifischen DNA-Bereichen die Promotorsequenzen finden. Das geschieht durch Assoziation an die und Dissoziation von der DNA. Es gibt experimentelle Hinweise (Ricchetti et al., 1988), daß das Auffinden von Promotoren durch eindimensionale Diffusion der RNA-Polymerase entlang der DNA beschleunigt wird.

2.) Bildung eines offenen RNA-Polymerase - Promotor - Komplexes: Nach der primären Bindung an die Promotorsequenz erfolgt der Übergang in einen stabilen offenen Komplex in mindestens drei Isomerisationsschritten:



wobei RP_c für geschlossenen Komplex (Walter et al., 1967; Chamberlin, 1974) und RP_i für intermediären Komplex (Buc und McClure, 1985; Roe et al., 1985) steht. RP_o bezeichnet den offenen RNA-Polymerase - Promotor - Komplex, der durch einen 12 bis 17 bp langen, einzelsträngigen DNA-Bereich (Siebenlist, 1979; Siebenlist et al., 1980; Gamper und Hearst, 1982; Kirkegaard et al., 1983) charakterisiert ist. Der offene Komplex ist sehr stabil (Halbwertszeit von mehreren Tagen bei 37°C) (Kadesch et al., 1982), wie Untersuchungen mit dem um die DNA kompetierenden Polyanion Heparin (Walter et al., 1967; Schäfer et al., 1973), gezeigt haben.

3.) Initiation der Transkription:

Die Initiation beginnt mit der Bindung der beiden ersten basenkomplementären Triphosphate an den binären Komplex und der Knüpfung der ersten Diesterbindung unter Abspaltung von Pyrophosphat. Während der Initiation sind die naszierenden RNA-Produkte noch nicht stabil an den ternären Komplex gebunden und können als abortiv gebildete Produkte abdissoziieren. Der Initiationskomplex ist bei hohen Salzkonzentrationen nicht stabil. Das Antibiotikum Rifampicin (Sippel und Hartmann, 1968)

inhibiert speziell die Synthese kurzer RNA-Produkte (McClure und Cech, 1978).

Der Übergang von der Initiation zur Elongation wird durch folgende Fakten gekennzeichnet: Die RNA-Produkte bleiben stabil an den ternären Komplex gebunden, sie können auch in Anwesenheit von Rifampicin verlängert werden. Der ternäre Komplex ist auch bei hohen Salzkonzentrationen stabil. Der σ -Faktor dissoziiert vom RNA-Polymerase - DNA - RNA - Komplex nach der Synthese eines ca. acht bis neun Nukleotide langen Produkts ab (Hansen und McClure, 1980).

4.) Verlängerung der DNA (Elongation):

Der ternäre Komplex, bestehend aus Coreenzym, DNA und RNA, ist durch folgende Eigenschaften charakterisiert: Die Bedeckungsmuster ("footprints") von Elongationskomplexen auf der DNA (ca. 30 bp Bedeckung) unterscheiden sich drastisch vom Muster binärer oder initiiender Komplexe (65-70bp Bedeckung; Carpousis und Gralla, 1985; Straney und Crothers, 1985; Schmitz und Galas, 1979; Spassky 1986). Im Elongationskomplex sind ca. 17 bp aufgeschmolzen, d.h. die DNA liegt einzelsträngig vor (Gamper und Hearst, 1982). Von den 17 einzelsträngigen Basen bilden 12 des codogenen Strangs mit der naszierenden RNA ein DNA-RNA - Hybrid (Hanna und Meares, 1983).

Die Elongation der RNA-Kette ist zwar prozessiv, die Geschwindigkeit der Transkription kann sequenzabhängig jedoch stark variieren, von ca. 60 Nukleotiden pro Sekunde (Heumann, 1978) bis zu weniger als 0.1 Nukleotid pro Sekunde (von Hippel et al., 1984). Solche Stellen extrem langsamer Transkription werden "pausing sites" genannt. Niedrige Substratkonzentrationen oder Sekundärstrukturen der naszierenden RNA können für "pausing" verantwortlich sein (Levin und Chamberlin, 1987).

5.) Beendigung der RNA-Synthese (Termination):

Es sind zwei grundsätzlich verschiedene Mechanismen der Termination bekannt, die rho-unabhängige und die rho-abhängige Termination. Rho-unabhängige Termination ist gekennzeichnet durch eine (G,C)-reiche palindromische Sequenz in der DNA (Rosenberg und Court, 1979), die es der naszierenden RNA erlaubt,

stabile Haarnadelstrukturen auszubilden, und eine darauffolgende poly-U-Sequenz in der RNA, die eventuell durch Destabilisierung des DNA-RNA - Hybrids die Dissoziation des Produkts begünstigt. Die Stabilität der Haarnadelstruktur bestimmt offensichtlich die Effizienz der Termination. Rho-abhängige Termination erfordert ein Pausieren der Elongation, um dem rho-Protein die Möglichkeit zu geben an naszierende, einzelsträngige RNA zu binden und die Termination zu bewirken (Kassavetis und Chamberlin, 1981; Morgan et al., 1984).

Die Transkription kann auf fast allen erwähnten Ebenen reguliert werden. Auf Initiationsebene z.B. führen nicht nur unterschiedlich starke Bindung der RNA-Polymerase an verschiedene Promotoren, sondern auch unterschiedliche Übergangsraten vom Initiations- in den Elongationsmodus zu unterschiedlichen Transkriptmengen und damit zu einer Regulation der Genexpression. Aktivatorproteine (z.B. CAP) oder Repressoren modulieren die Transkription in Abhängigkeit vom Vorkommen bestimmter Effektoren. Die Elongationsgeschwindigkeit kann durch "pausing sites" reguliert werden. Vielfältig sind die Steuerungsmöglichkeiten auf Terminationsebene. Bei der Antitermination z.B. werden Terminationsraten durch die Verhinderung von terminierenden Sekundärstrukturen erniedrigt. Beim Sonderfall der Attenuation beeinflussen Produkte von Operons die Transkriptionsrate. Auch Regulationsproteine wie NusA oder Tau haben über die Termination Einfluß auf die Genexpression.

Das Ziel dieser Arbeit war es, einen experimentellen Beitrag zur Aufklärung des Mechanismus der Translokation während der RNA-Synthese zu leisten. Über diesen Abschnitt der Transkription existieren zwar eine Reihe theoretischer Betrachtungen und Spekulationen, jedoch sehr wenig experimentelle Daten (siehe Yager und von Hippel, 1987).

Die RNA-Polymerase erfüllt während der Elongation zwei unterschiedliche Funktionen:

a) Katalyse der RNA-Kettenverlängerung

Dieser Prozeß umfaßt die Bindung des naszierenden Produkts und des neu eintretenden Triphosphats sowie die Knüpfung einer

Diesterbindung unter Abspaltung von Pyrophosphat. Die Reaktion hat ein ΔG° von -2.6 kcal/mol (Yager und V. Hippel, 1987).

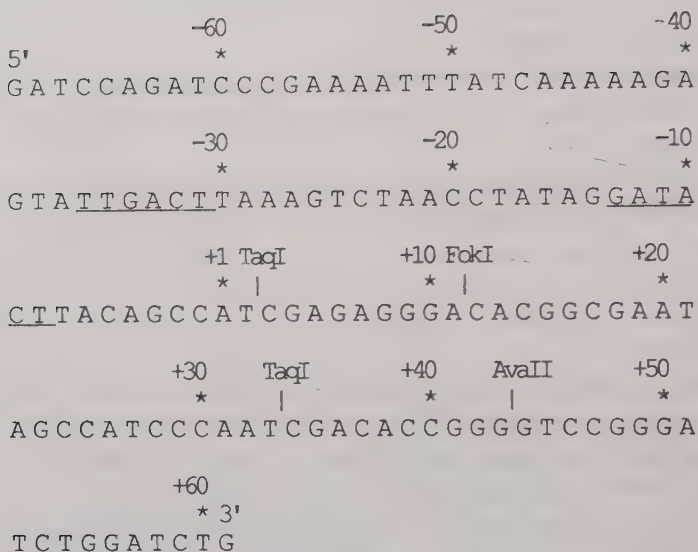
b) Translokation der RNA-Polymerase

Es ist bislang nicht klar, wie man sich die Fortbewegung der RNAP auf der DNA vorstellen soll. Folgende zwei Modelle wurden bisher vorgeschlagen:

1. Das Rotationsmodell (Dennis und Sylvester, 1981) fordert zwei katalytische und zwei Rotationszentren. Die Polymerase bewegt sich durch Drehung um jeweils 180° um eines der beiden Rotationszentren nach vorne, abwechselnd werden die beiden katalytischen Zentren zur Knüpfung der Diesterbindungen verwendet.

2. Ein von Gamper und Hearst (1982) vorgeschlagenes Modell, das, leicht modifiziert, auch von Yager und v.Hippel (1987) favorisiert wird, postuliert eine sich gleichmäßig in Transkriptionsrichtung bewegende "Transkriptionsblase" einzelsträngiger DNA. Der codogene Strang bildet über ca. 12 Basen mit der naszierenden RNA ein Hybrid. Aktive Zentren werden sowohl für die Katalyse der Nukleotidverknüpfung als auch für die Entwindung der DNA-Doppelhelix und für die Trennung des DNA-RNA-Hybrids gefordert. Die RNAP soll sich wie die "Mutter auf einer Schraube" vorwärts bewegen.

Meine Experimente sollten die Gültigkeit der beiden Modelle überprüfen. Als Matrize für die RNA-Polymerase wurde der A1-Promotor des Phagen T7 gewählt, weil er a) sowohl wegen seiner Bindungskonstante für RNA-Polymerase als auch von seiner Initiationseffizienz als sehr starker Promotor einzustufen war (Hawley et al., 1983; Deuschle et al., 1986) und b) weil an der Wildtypsequenz bei Initiation mit einem Oligonukleotid (ApUpC) und GTP, ATP bzw. GTP, ATP, CTP ein stabiles Transkriptionsstadium (RNA-Kette mit 11 bzw. 20 Nukleotiden Länge) entstehen sollte. Der nicht-codogene Strang des 130 bp-DNA-Fragments, das von Pos. -54 bis +46 identisch mit dem A1-Wildtyppromotor ist, hat folgende Sequenz:



Bei den Experimenten wurden drei Schwerpunkte gesetzt:

1. Zur Abklärung der optimalen Stöchiometrien, Temperatur- und Ionenstärkebedingungen für die beiden Komponenten der Translokationsversuche, RNA-Polymerase und A1-DNA-Fragment, wurde eine Gelretardierungstechnik (Fried und Crothers, 1981; Garner und Revzin, 1981) etabliert.
2. RNA-Synthese und Translokation sind dynamische Prozesse. Ihre Untersuchung mit biochemischen Methoden erforderte ein "Einfrieren" der RNA-Synthese in bestimmten Rastern. Ein möglichst dichtes Netz von Transkriptionsstadien mit fest gebundenen Produkten definierter Länge mußte erzeugt werden. Dazu war es nötig, die A1-Wildtypsequenz gezielt zu mutieren.
3. Als Methode zur Untersuchung der unterschiedlichen Transkriptionsstadien sollte Exonuklease III-Verdau verwendet werden. Exo III-"footprints" versprachen als einzige Methode, Veränderungen der RNA-Polymerase auf der DNA während der Translokation auf ein Nukleotid genau zu erfassen.

II. Material und Methoden

II.1. Präparation von Coreenzym

Bakterien der Art *E. coli* B wurden in einem Medium gezogen, das pro Liter 10 g Pepton, 15 g Yeast Extract (Difco), 0.75 g NaOH, 33 mg CaCl_2 , 10 mg Gelatine, 1 g NH_4Cl , 615 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 25 ml Glycerin, 5 g Glukose (gesondert in Wasser gelöst und sterilisiert), 6.53 g K_2HPO_4 und 2.875 g KH_2PO_4 , wasserfrei (beide ebenfalls in H_2O gelöst und sterilisiert) enthielt. Die Zucht wurde in einem 200 Liter-Fermenter durchgeführt.

RNA-Polymerase wurde aus den Bakterien im wesentlichen nach dem Verfahren von Zillig et al. (1970a) gewonnen. Die wichtigsten Schritte bei der Isolierung sind (kurz zusammengefaßt):

- a) Lyse der Zellen mit Frenchpress
- b) Fällung mit 30% Polymyxin P
- c) Waschen des Präzipitats mit 0.6M Ammoniumchlorid
- d) Eluieren des Proteins mit 1.2M Ammoniumchlorid
- e) Ammoniumsulfatfällung
- f) Batch-Elution mit DEAE 52 (Whatman)
- g) Sukrosegradientenzentrifugation
- h) Biorex 70 (Bio-Rad)-Säulenelution

Nur die Fraktion, die Coreenzym enthielt, wurde für die Rekonstitution (siehe II.3) verwendet.

II.2. Präparation der σ -Untereinheit

Die σ -Untereinheit wurde aus dem überproduzierenden *E. coli* - Stamm M 5219/ pMRG 8 isoliert. Zucht des Stammes und Reinigung von σ erfolgten nach der Methode von Gribskow und Burgess (1983).

II.3. Rekonstitution von E σ aus Coreenzym und σ

Coreenzym und σ wurden im Gewichtsverhältnis 50 : 12 (Stöchiometrieverhältnis 1 : 1.3) in 20% Glycerin, 50 mM NaCl, 8 mM Tris/HCl pH 7.9 und 10 mM Mercaptoethanol gemischt.

Die Konzentration wurde auf 10 mg Protein/ml eingestellt. Nach einer Inkubation für 10 min bei 37° C wurden Aliquots in flüssigem N₂ eingefroren und gelagert. Jedes Aliquot wurde höchstens zweimal aufgetaut.

II.4. Reinigung der DNA-Fragmente

II.4.1. Reinigen des A1-Fragments

Ein 130 bp langes DNA-Fragment, das den starken Promoter A1 des Phagen T7 enthält (Wildtypsequenz von -54 bis +46, die restlichen Sequenzen von -70 bis -54 und von +46 bis +61 sind Polylinkersequenzen), wurde gemäß Heumann et al., (1987) im Makromaßstab präpariert. Die einzelnen Schritte sind:

- a) Klonieren des A1-Fragments in den Vektor pDS1/ T_O1+
- b) Transformation der Plasmide
- c) Zellzucht in reichem Medium
- d) Lyse der Zellen
- e) Fraktionierte PEG-Fällung
- f) Hitzeschritt zum Abtrennen von Protein
- g) RNase-Verdau
- h) Phenolisation und Isopropanolfällung
- i) RPC-5 (Serva)-batch-Elution
- j) Bam H I-Verdau
- k) Anreichern des A1-Fragments in Gegenwart von Spermidin in Phasengemisch Phenol/Wasser
- l) Abtrennen des Fragments von der Vektor-DNA auf einer PEG-8000 (Sigma) - Dextran T-500 (Pharmacia)- Zweiphasensäule
- m) Abtrennen des PEG - Dextran über RPC-5 Säule
- n) Konzentrieren des A1-Fragments

II.4.2. Erzeugen der Mutationen

Für Versuche, bei denen die Transkription durch selektives Weglassen von Nukleotiden in definierten Rastern gestoppt wurde, war es aufgrund der Sequenz des Wildtyppromotors nötig, diese Sequenz definiert zu mutieren. Damit war es möglich, die Zahl der gewünschten Haltepunkte der Transkription zu erweitern.

Die dabei gewählte Strategie war folgende: Anstelle der Wildtypsequenz zwischen den Restriktionsschnittstellen bei Pos. +2 (Taq I) und +11 (Fok I) wurden synthetisch erzeugte Oligonukleotidsequenzen in die stromabwärts liegende Region des Promotors kloniert. Die Klonierung umfaßte folgende Schritte:

a) Schneiden des A1-Fragments (besitzt zwei Bam H I-Enden) mit den Restriktionsenzymen Taq I (Boehringer, Mannh.) und Fok I (Biolabs). Die Bam H I-Enden des Gesamtfragments (130 bp) wurden vor dem Schneiden mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (CIP; Boehringer, Mannh.) dephosphoryliert, um später Selbstligation zu verhindern.

b) Hybridisierung der nach der Phosphit-Triester-Methode synthetisierten einzelsträngigen Oligonukleotide durch Erhitzen auf 60° C und anschließendes langsames Abkühlen im Wasserbad. Die Sequenzen der Oligonukleotide waren so gewählt, daß nach der Hybridisierung ein (palindromisches) Taq I-Ende und ein der Fok I-Schnittstelle bei Pos. +11 identisches (nicht-palindromisches) Ende entsteht. Außerdem enthält jedes Oligonukleotid eine Mbo II-Erkennungssequenz, die später ein schnelles Überprüfen der neukonstruierten Sequenz bezüglich der Mutation ermöglichen sollte. Die Oligonukleotide haben nach ihrer Synthese am 5'-Ende eine OH-Gruppe, die bei der späteren Ligation dafür garantiert, daß eine Selbstligation der doppelsträngigen Oligonukleotide über die Taq I-Enden nicht möglich ist. Die Fok I-Enden sind ohnehin nicht palindromisch, so daß eine Selbstligation ausgeschlossen werden kann. Die doppelsträngigen Oligonukleotide hatten folgende Sequenzen:

M I: CGAGAGGGAAGAGG
TCTCCCTTCTCCGTGC

M II: CGAGAGGGAAGAGAGAGG
TCTCCCTTCTCTCTCCGTGC

M III: CGAGAGGGAAGAGAGAGAGG
TCTCCCTTCTCTCTCTCCGTGC

M IV: CGAGAGGGAAGAGAAGAGAGAGAGG
TCTCCCTTCTCTTCTCTCTCTCCGTGC

M V: CGAGAGGGAAGAGAAGAAGAGAGAGAGG
TCTCCCTTCTCTTCTCTCTCTCTCCGTGC

c) Reinigung der Bam H I - Taq I (-70 bis +2) und der Fok I - Bam H I (+12 bis +61)-Fragmente mittels FPLC mit einer Mono Q-Ionenaustauschersäule (Pharmacia).

d) Ligation der synthetischen Oligonukleotidsequenzen zwischen die Bam H I -Taq I und Fok I - Bam H I-Fragmente. Je 12 pmol der flankierenden Fragmente wurden mit 150 pmol doppelsträngigem Oligonukleotid gemischt. Die Ligationsansätze wurden für 15 h bei 16° C in Gegenwart von 12 Einheiten T4 - DNA-Ligase inkubiert.

e) Ligation der mutierten A1-Sequenzen in den Vektor pDS1/T₀1⁺. Das Plasmid pDS1/T₀1⁺ (Stueber und Bujard, 1982) wurde durch einen Bam H I-Schnitt linearisiert und mit einem Aliquot des oben unter d) beschriebenen Ligationsansatzes gemischt. Ligiert wurde wieder bei 16° für 15 h mit T4 - DNA-Ligase.

f) Transformation der mutierten Plasmide und Überprüfen der Klone. Ein Teil des unter e) erwähnten Ligationsgemischs wurde in kompetente Zellen des *E. coli*-Stammes Wk 6 transformiert und auf Chloramphenicolplatten (25 mg/ml) auf funktionelle Promotoren untersucht. (Das Plasmid pDS1/T₀1⁺ wurde von Stueber und Bujard so konstruiert, daß nur starke Promotoren ein Durchlesen über den hinter der multiplen Klonierstelle gelegenen Terminator t₀ erlauben und dadurch die Expression des Chloramphenikol-Acetyltransferase-Genes ermöglicht wird.)

Positive Klone wurden im 10ml-Maßstab gezogen. Die Plasmide wurden nach der Methode von Birnboim und Doly (1979) isoliert, nach Schneiden der Plasmide mit Bam H I zeigte sich, daß nur Klone mit Insert isoliert wurden. Nachschneiden der Insertionen mit Mbo II (BRL) ergab für alle Klone ein positives Ergebnis. Mutierte Insertionen zeigten außerdem, nach Markierung mit ^{32}P , ein ihrer Länge entsprechendes, verändertes Laufverhalten gegenüber dem 130 bp-A1-Fragment in einem 6%igem Sequenzgel. Der endgültige Beweis, daß es sich um die gewünschten Mutationen handelte, wurde durch Umklonieren des Bam H I-Fragments in das Phasmid pMC 5-8 (Stanssens et al., in Vorbereitung) erbracht. Dieses Phasmid enthält außer dem normalen Col E1-Replikationsorigin noch den des Phagen f1 und kann daher, in mit dem Phagen M13 infizierten Zellen, als Einzelstrang verpackt werden. Diese Tatsache erlaubte das Sequenzieren nach der Didesoxymethode von Sanger, (1977) und führte letztlich zur Bestätigung der mutierten Sequenzen.

II.4.3. Präparation und Reinigung der mutierten Sequenzen

Die mutierten A1-Sequenzen wurden im Gegensatz zum A1-Wildtypfragment nicht im Makromaßstab präpariert, da sie nur für biochemische, und nicht außerdem noch für biophysikalische Messungen (Neutronenkleinwinkelstreuung, Dissertation von H. Lederer) gebraucht wurden. Die mit den pDS1/T₀1 A1 Mut I bis V transformierten Zellen vom *E. coli*-Stamm Wk 6 wurden im 10 l-Maßstab in LB-Medium gezogen. Die Plasmide wurden nach der "cleared lysate"-Methode (Hillen et al., 1981) gewonnen und anschließend über eine Nucleogensäule (Diagen) gereinigt. Die mutierten Fragmente wurden mit Bam H I herausgeschnitten und anschließend über eine Mono Q-Ionenaustauschersäule (Pharmacia) vom Restvektor abgetrennt.

II.4.4. Endmarkierung von Fragmenten für "footprinting"-Experimente

A1-Wildtyppromotorfragmente oder mutierte Fragmente mußten vor den "footprinting"-Versuchen am 5'-Ende mit ^{32}P markiert

werden. Dazu wurden die 5'-Enden mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (CIP) dephosphoryliert (in 50mM Tris/HCl Puffer, pH 8.3) und anschließend nach Maniatis (1982) mit $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP (Amersham) markiert. Durch Nachschneiden eines Teils der an beiden 5'-Enden radioaktiv markierten Fragmente mit Ava II erhielt man Fragmente, die die gesamte funktionelle Promotorsequenz beinhalten, um 18 Basenpaare kürzer sind als die Ausgangsfragmente, aber nur am stromaufwärts liegenden Ende eine Markierung tragen.

Die markierten DNA-Fragmente wurden mit Hilfe zweier alternativer Methoden gereinigt, je nach erforderlichem Reinheitsgrad. Die saubersten Fragmente erhielt man durch Reinigung der DNA über 6%ige Acrylamidgele unter nicht-denaturierenden Bedingungen. Die Fragmentbanden wurden aus dem Gel geschnitten, durch eine abgebrochene Kanüle gepreßt, zweimal gefroren und wieder aufgetaut und schließlich auf eine Nacs-Prepac-Säule (BRL) aufgetragen. Nach Hochsalzelution und Ethanol-fällung erhielt man die sauberen DNA-Fragmente.

Ein wesentlich schnellerer Weg, überschüssige Nukleotide zu entfernen, war die Ultrafiltration in einem Centricon 10-Röhrchen (Amicon) nach vorheriger Phenolisation.

II.5. Präparation von ApUpC (mit ^{32}P markiert und unmarkiert)

Das Trinukleotid ApUpC erwies sich bei den Transkriptionsversuchen am A1-Promotor als ein effektiver "Starter", mit dessen Hilfe es möglich war durch Weglassen von UTP und CTP eine RNA-Kette von 11 Nukleotiden, und durch Weglassen von UTP eine RNA-Kette von 20 Nukleotiden zu erzeugen.

ApUpC wurde durch einen abortiven Transkriptionsansatz (McClure, 1978) synthetisiert. Ein aus dem 130 bp-A1-Promotorfragment und RNAP gebildeter binärer Komplex wurde durch Zugabe des käuflichen Dinukleotids ApU (Sigma), CTP und Mg^{++} zur abortiven Produktion von ApUpC gebracht. Das gekaufte ApU wurde vorher über ein 20%iges Acrylamidgel (Prozedur wie unten für ApUpC beschrieben) nachgereinigt.

Ein typischer Ansatz von nicht radioaktiv markiertem ApUpC sah folgendermaßen aus:

binärer Komplex aus: 0.3 nmol A1-Fragment

0.45 nmol E σ in 8mM Tris/HCl Puffer, pH 7.9

+ 150 nmol ApU

+ 1 μ mol CTP

+ MgCl₂ (6mM Endkonzentration)

Gesamtvolumen 50 μ l

Der Ansatz wurde 5 h bei 37° C inkubiert, anschließend (1:1; v:v) mit Formamid, das als Farbmarker Bromphenolblau enthielt, versetzt und auf ein 20%iges präparatives Acrylamidgel (12.5 mM Tris / 10.5 mM Borat / 0.12 mM EDTA, pH 8.6) aufgetragen. Die ApUpC Bande wurde unter UV-Licht (254 nm) ausgeschnitten und über Nacht in 10ml H₂O geschüttelt. Das eluierte ApUpC wurde in einer Speedvac-Vakuumentrifuge lyophilisiert und anschließend in H₂O gelöst.

Die Präparation von radioaktiv markiertem ApUp*C war der Präparation von ApUpC sehr ähnlich. Die Mengen an binärem Komplex wurden um Faktor 10 reduziert, die an ApU um Faktor 20. Zur Verlängerung wurde ausschließlich α ³²P-CTP (Amersham) mit einer spezifischen Aktivität von >400 Ci/mmol verwendet. Meist wurde mit 20 μ Ci markiert. Die Reinigung und Elution aus dem Gel waren identisch mit der oben beschriebenen, mit der einen Ausnahme, daß die ApUp*C Bande nicht durch UV-Licht, sondern durch Belichten eines Röntgenfilms (Trimax von 3M) kenntlich gemacht wurde.

II.6. Ausbildung von binären und ternären Komplexen.

II.6.1. Untersuchungen zu intermediären Stadien von DNA - RNAP - (RNA)-Komplexen

Bei diesen Versuchen (siehe Ergebnisteil III.1.) wurden generell relativ hohe Konzentrationen an DNA und Proteinen verwendet, um beim Anfärben der Komplexe in nicht-denaturierenden Acrylamidgelen mit EtBr (DNA) bzw. Coomassie-Brilliant-Blue (Protein) deutlich über der Nachweisgrenze zu liegen. So wurden in einem typischen Versuchsansatz 12 pmol DNA und zwischen 4 und

36 pmol variierende Mengen RNAP eingesetzt. Die Komplexbildung erfolgte bei 37° C in 8mM Tris/HCl pH 7.9; 50mM NaCl; 1mM Mercaptoethanol. Die Inkubationsdauer betrug 5 min. Anschließend wurde bei Raumtemperatur für 1 h gegen 8mM Tris/HCl pH 7.9; 1mM Mercaptoethanol dialysiert. Dazu wurden VSWP-Filterplättchen von Millipore (0.025 µm Porengröße) verwendet. Wurde entweder abortive oder "run-off"-Transkription zugelassen, war eine Endkonzentration von 8mM Tris/HCl pH 7.9; 6mM MgCl₂ und 10⁻⁴ M an allen verwendeten Triphosphaten normal. ATP, GTP, CTP, UTP wurden als HPLC-gereinigte Triphosphate bei ICN gekauft. Markiert wurde die RNA mit α³²P-UTP (Amersham) dessen Konzentration bei den verwendeten Mengen vernachlässigt werden konnte. Das Volumen der Ansätze war in der Regel 10-20µl.

II.6.2. Ausbildung von Komplexen, die anschließend durch Exonuklease III-"footprinting"-Versuche untersucht werden sollten

Da in diesen Experimenten 5'-endmarkierte DNA-Fragmente verwendet wurden, konnten die Konzentrationen der eingesetzten DNA-Mengen auf 1 bis 3 pmol pro Ansatz gesenkt werden. RNAP wurde in bis zu 20fach stöchiometrischem Überschuß zugegeben. Die Bedingungen für die Bildung binärer Komplexe waren die gleichen wie unter II.6.1. angegeben. Nach der Dialyse gegen 8mM Tris/HCl wurde der Exonuklease III-Verdau entweder sofort gemacht (binärer Komplex), oder zuerst eine RNA-Kette definierter Länge transkribiert. Die Bedingungen für den Transkriptionsansatz waren:

8mM Tris/HCl, pH 7.9

6mM MgCl₂

3fach molarer Überschuß an nicht markiertem ApUpC im Vergleich zum DNA-Fragment (3-10 pmol)

ApUp* C (je nach benötigter Radioaktivität 50-1000 Bq)

Triphosphate: 2 · 10⁻⁵M Endkonzentration

Probenvolumen: 20µl

Der Transkriptionsansatz wurde im Normalfall 40 min bei 37° C inkubiert, anschließend wurde entweder mit 3fach molarem

Überschuß (zur Mg^{++} Konzentration) an EDTA gestoppt (falls nur die Produkte analysiert werden sollten), oder mit Exo III verdaut.

II.7. Abortiver Transkriptionsansatz zur Messung der Transkriptionsaktivität

Binäre Komplexe wurden mit 12 pmol A1-Fragment, 6 pmol Coreenzym und unterschiedlichen Mengen σ -Faktor ausgebildet. Es wurden zugegeben:

$MgCl_2$ (Endkonz.: 6mM)

ATP (Endkonz.: $10^{-3}M$)

UTP (Endkonz.: $10^{-3}M$)

α - ^{32}P UTP (~1000 Bq)

Gesamtvolumen: 20 μ l

Der Ansatz wurde für zehn Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die in pppAp*U inkorporierte Radioaktivität mit dem nicht eingebauten UTP verglichen, nachdem die Proben auf PEI-Dünnschicht-Cellulose-Platten (Merck) aufgetragen wurden. Die Flecken, die dem pppAp*U bzw. dem α - ^{32}P -UTP entsprachen, wurden abgekratzt und die Radioaktivität im Szintillationszähler bestimmt. Das Laufmittel für die PEI-Celluloseplatten bestand aus 0.2 M Kaliumphosphatpuffer, pH 8.0, mit 10% Ethanol.

II.8. Exonuklease III-"footprinting"-Experimente

Vor dem Exo III-Verdau verschiedener Promotor-Polymerase-Komplexe (binäre und ternäre) wurden immer 20-30fach überstöchiometrische Mengen an Heparin (Hoffmann la Roche) zu den Ansätzen gegeben, um unspezifische (d.h. nicht promotorgebundene) Komplexe zu zerstören. Die Exo III-Verdaue wurden im gleichen Puffer wie die Transkription durchgeführt. Nach Zugabe von 50-200 Einheiten Exo III wurde für 40 min bei 37°C inkubiert. Da in fast allen Chargen von Exo III (das meistens von BRL gekauft wurde) eine Nebenaktivität war, die die 5'-Markierung der DNA abspaltete, wurde zur größtmöglichen Unterdrückung dieses Effekts zu den Ansätzen *E. coli*-t-RNA (0.5 mg/ml Endkonzentration) gegeben. Die Exo III-Verdaue wurden wahlweise

mit EDTA gestoppt (und dann gegen 8mM Tris/HCl, pH 7.9 dialysiert um Salzeffekte auszuschließen) oder direkt, nach Zugabe von 10Vol% einer 40%igen Saccharoselösung, die mit etwas Bromphenolblau angefärbt war, auf ein nicht-denaturierendes Acrylamidgel aufgetragen.

II.9. Gel-Elektrophoresen

II.9.1. Nicht-denaturierende Acrylamidgele

Die Gele enthielten 2.7% Acrylamid, 0.07% Bisacrylamid in 8mM Tris/HCl, pH 7.9 Puffer. Aufgrund der weichen Konsistenz der Gele wurden sie durch "Silanisieren" einer Glasplatte mit γ -Methacryloxypropyltrimethoxysilan kovalent an diese gebunden, was die Handhabung der Gele wesentlich vereinfachte. Die andere Glasplatte wurde durch Dichlordimethylsilan in Chloroform hydrophob gemacht und ließ sich deshalb leichter vom Gel ablösen. Zwei Gelgrößen fanden Verwendung, eine mit 16.5x13 cm Glasplatten, 1.5 mm Gelstärke und 9 Taschen und eine zweite mit 20x20 cm Glasplatten, 1 mm Gelstärke und 15 Taschen. Proben, die auf ein nicht-denaturierendes Gel aufgetragen werden sollten, wurden durch Zugabe von 10 Vol% einer 40%igen Saccharoselösung, die mit etwas Bromphenolblau angefärbt war, beschwert, um nicht aus den Taschen zu diffundieren. Die Gele liefen bei 20 Volt/cm für ca. 2 h unter ständigem Umpumpen des Laufpuffers, um einen pH-Abfall in der Anodenkammer zu verhindern. Bei ausreichenden DNA-Konzentrationen wurden die Komplex- und freien DNA-Banden in einer 0.005%igen EtBr-Lösung angefärbt. Die Proteinfärbung erfolgte in 0.25%iger Coomassie-Brilliant-Blue - Lösung in 4.5 : 4.5 : 1; H₂O : Methanol : Eisessig ; (v:v:v). Zum Entfärben der Gele diente 8.75 : 0.5 : 0.75 ; H₂O : Methanol : Eisessig. Radioaktiv markierte Banden wurden durch Exposition von Trimax (3M) Röntgenfilmen mit Trimax-Verstärkerfolien bei -70° C, sichtbar gemacht.

Es wurden zwei Methoden zur Elution der endmarkierten und Exo III-verdauten DNA-, bzw. der markierten RNA-Produkte verwendet:

- a) Schütteln der ausgeschnittenen Gelstücke in 1 ml 20%igem Phenol über Nacht. Abpipettieren der wäßrigen Phase und Extraktion mit Chloroform. Anschließend wurde die wäßrige Phase in einer Speedvac-Vakuumzentrifuge getrocknet.
- b) Schütteln der ausgeschnittenen Gelstücke in 1 ml H₂O über Nacht nach vorherigem Kochen für 15 min. Die Proben wurden nach Entfernen der Gelreste ebenfalls in einer Speedvac-Vakuumzentrifuge einrotiert. Diese Methode war zwar etwas schneller und einfacher zu handhaben, führte aber zu einer etwas stärkeren Degradation der eluierten DNA.

II.9.2. Sequenzgele

Die verwendeten Sequenzgele enthielten entweder 6% Acrylamid/0.3% Bisacrylamid, 8% AA/0.066% Bis oder 20% AA/0.165% Bis, außerdem 7M Harnstoff in 100mM Tris, 84mM Borat, 1mM EDTA pH 8.6 .

Die Größe der Gele war 20 · 40 cm (nicht temperierte Gele) bei einer Stärke von 0.5 mm, bzw. 20 · 55 cm (temperierte Gele) bei einer Stärke von 0.2 mm.

Die Proben wurden in 30-100%igem, deionisiertem Formamid, das als Farbmarker Bromphenolblau und Xylencyanol enthielt, aufgetragen. Außerdem wurden sie vor dem Auftrag für 5 min gekocht und dann auf Eis gestellt, um ein Renaturieren der DNA zu verhindern.

Die nicht-temperierten Gele liefen mit einer konstanten Leistung von 40 W, die temperierten mit 50 W und bei 50° C.

Für die Analyse von RNA-Produkten wurden 20%ige Gele verwendet, für die Analyse von Exo III-verdauter DNA entweder 6%ige nicht-temperierte, oder 8%ige temperierte.

II.9.3. SDS - Gele

SDS - Gele zur Auftrennung der Untereinheiten der RNA-Polymerase wurden nach Laemmli (1970) angefertigt. Die Färbung erfolgte wie in II.9.1 mit Coomassie-Brilliant-Blue.

II.10. Quantifizierung von Gelbanden

Die Färbung von Komplexbanden in Autoradiogrammen, Negativen von EtBr-gefärbten Gelen, oder von mit Coomassie-Blue gefärbten Gelen, wurde mit einem Joyce-Löbel - Scanner abgetastet und durch Eichung mit bekannten DNA- oder Proteinmengen quantifiziert.

III Ergebnisse

III.1. Überlegungen zur experimentellen Untersuchung der Translokation

III.1.1. Erzeugung von definierten ternären Transkriptionsstadien

Um die Translokation der RNA-Polymerase untersuchen zu können, war es notwendig, ein Konzept zu entwickeln, das ein "Einfrieren" der RNA-Synthese in definierten Rastern ermöglichte. Der Vergleich von Komplexen in mehreren verschiedenen Rastern sollte Rückschlüsse auf den Mechanismus der Translokation erlauben.

Das Weglassen von ein oder zwei Triphosphaten in einem *in vitro* Transkriptionsansatz führt zum Abbruch der naszierenden RNA-Kette, sobald eines der fehlenden NTPs zur RNA-Verlängerung benötigt wird. Unterhalb einer kritischen Länge von ca. 8-10 Nukleotiden dissoziieren die so entstandenen RNA-Produkte vom RNA-Polymerase - DNA - Komplex ab, und es kommt zur Reinitiation der RNA-Synthese. Diese instabile Initiationsphase muß bei der Untersuchung von Transkriptionsstadien der Elongation übersprungen werden.

Minkley und Pribnow, (1973) haben gezeigt, daß die Transkription mit Di- oder Trinukleotiden spezifisch initiiert werden kann. Levin et al., (1987) haben das für drei verschiedene Promotorsequenzen, darunter die A1-Sequenz, bestätigt. In der A1-Promotorsequenz kommen kurz nach dem Initiationspunkt an Pos. +2 bzw. +3 ein T und ein C vor, das nächste T bzw. C folgt dann erst wieder an Pos. +21 bzw. +12. Bei Initiation mit dem Trinukleotid ApUpC (der Phosphorylierungsgrad des 5'-Endes der Starteroligonukleotide spielt keine Rolle) und GTP, ATP bzw. GTP, ATP, CTP sollten Komplexe mit stabil gebundenen 11er- bzw. 20er-Produkten entstehen. Die zusätzliche Verwendung von Stopnukleotiden wie O-Methyl-CTP oder -UTP (Straney und Crothers, 1985), ergäbe a) jeweils um ein Nukleotid längere RNA-Produkte und b) eventuell größere Spezifität des Kettenabbruchs.

Der T7-A1-Promotor erwies sich für meine Experimente als eine geeignete Matrize, weil eine Fok I-Restriktionsschnittstelle sehr günstig vor dem C an Pos. +12 der Wildtypsequenz liegt. Dadurch wurde es möglich, die Zahl der stabilen Transkriptionsraster durch Mutieren der A1-Wildtypsequenz zu erweitern. Die Mutationen wurden durch Einfügen verschieden langer G,A-Sequenzen zwischen Pos. +11 und +12 erzeugt, jede Mutante konnte bei alternativer Initiation entweder mit ApUpC, GTP, ATP oder mit ApUpC, GTP, ATP, CTP zwei zusätzliche ternäre Transkriptionsraster erschließen, die sich in der Länge ihrer Produkte um jeweils neun Nukleotide unterschieden.

III.1.2. Charakterisierung definierter ternärer Transkriptionsstadien

Zur Charakterisierung von in definierten Rastern "eingefrorenen" Transkriptionsstadien steht nur eine begrenzte Auswahl an biochemischen Methoden zur Verfügung. Verbrückungs- (Chenick et al., 1981) oder Modifizierungsexperimente durch Alkylierung der DNA (Siebenlist et al., 1980) liefern zu grobe oder sequenzabhängige Resultate, um Translokation auf ein Nukleotid genau erfassen zu können. Dasselbe trifft für verschiedene "footprinting"-Techniken zu. DNase I-Verdau wurde zwar schon erfolgreich zur Charakterisierung von binären und ternären Komplexen eingesetzt (Schmitz und Galas, 1979; Carpousis und Gralla, 1985; Spassky, 1986), die Methode hat aber den Nachteil, daß DNase I Spaltpräferenzen für bestimmte Sequenzen besitzt. Das kann dazu führen, daß kleinere Änderungen im Protektionsmuster unerkant bleiben. Hydroxylradikal-"footprinting" (Tullius und Dombroski, 1986) führt zwar zu sequenzunabhängigen Protektionsmustern, ist aber aufgrund der fließenden Übergänge zwischen geschützten und ungeschützten Bereichen nicht geeignet, Verschiebungen von Mustern um ein Nukleotid feststellen zu können.

Genau das sollte, betrachtet man die Ergebnisse anderer Autoren (Shalloway et al., 1980; Siebenlist et al., 1980; Straney und Crothers, 1987), mit Exonuklease III-"footprinting" möglich sein. Exo III ist eine doppelstrangspezifische, prozessive Exonuklease,

die jeweils einen DNA-Strang vom 3'- zum 5'-Ende hin verdaut. DNA-bindende Proteine bringen den sukzessiven Abbau der DNA zum Stillstand und hinterlassen einen für dieses Protein charakteristischen Bereich doppelsträngiger DNA (siehe auch Schema in Abb. 20). Nach Markierung eines oder beider 5'-Enden des DNA-Fragments ist es möglich, die vom Protein bedeckte Region zu bestimmen. Die Vorteile der Methode liegen in der hohen Genauigkeit, mit der die Grenzen des geschützten DNA-Bereichs bestimmt werden können und der, durch die große Breite der Pufferbedingungen, leichten Durchführbarkeit des Verdaus. Der Nachteil des Exonuklease III-Verdaus ist die Beschränkung, daß der durch die RNA-Polymerase geschützte Bereich nur auf je einem DNA-Strang betrachtet werden und daß keine zusätzliche Information über Einzelheiten innerhalb der bedeckten Region, wie z.B. Bindung der RNAP auf nur einer Seite der DNA, erhalten werden kann.

III.2. Charakterisierung intermediärer Stadien der Transkription mittels nicht-denaturierender Acrylamidgele

Bevor die eigentliche Fragestellung nach dem Mechanismus der Translokation experimentell angegangen werden konnte, mußten noch einige Eigenschaften binärer und ternärer Komplexe geklärt werden, um die Bedingungen für die Translokations- und "footprinting"-Versuche zu etablieren und zu optimieren. Stöchiometrien zwischen RNA-Polymerase und dem 130 bp-A1-Fragment, Art der Komplexe und Resistenz gegenüber dem Kompetitorpolyanion Heparin sowie Einfluß von Ionenstärke und Temperatur auf die Stabilität der Komplexe waren zu untersuchen. Garner und Revzin (1981) sowie Fried und Crothers (1981) beschrieben als erste eine Methode zur Charakterisierung von Protein-DNA - Komplexen mittels nicht-denaturierender Acrylamidgele. Diese Methode sollte eine schnelle und zuverlässige Beantwortung dieser Fragen erlauben.

III.2.1. Stöchiometrien und Einfluß von Heparin

Protein-DNA-Komplexe zeigen in nicht-denaturierenden Acrylamidgelen unterschiedliche elektrophoretische Beweglichkeit im Vergleich zur freien DNA oder zum freien Enzym. Das Verhältnis von Protein zur DNA in den Komplexbanden läßt sich durch Verwendung von ^{32}P -markierten DNA-Fragmenten und durch Anfärben des Proteinanteils mit Coomassie-Brilliant-Blue quantifizieren. Zusätzliches Anfärben der DNA mit dem interkalierenden Ethidiumbromid erlaubt Rückschlüsse auf die Größe der vom Protein bedeckten DNA-Bereiche, da EtBr nur in frei zugängliche DNA interkalieren kann.

III.2.1.1. Zugabe von steigenden Mengen Coreenzym zu einer konstanten Menge DNA-Fragment

Bevor die Bindung von Holoenzym an den A1-Promotor näher untersucht wurde, sollten einige Charakteristika der Coreenzym-Promotor - Bindung erarbeitet werden. Es gibt Hinweise, daß Coreenzym Promotoren erkennt (Chenchick et al., 1981), außerdem aber auch unspezifisch an DNA bindet. Getestet wurde a) ob diese Bindungen stabil sind, das heißt ob sie im nicht-denaturierenden Acrylamidgel definierte Banden ergeben und b) wie die Zugabe des Kompetitorpolyanions Heparin dieses Bandenmuster verändert.

Zu je 12 pmol A1-Fragment wurde Coreenzym in steigenden Mengen (0.33 : 1 bis 3 : 1) gegeben. Man erkennt auf Abb. 1, daß bis zu drei Moleküle Coreenzym an einem A1-DNA-Fragment binden können. Heparin, ein Kompetitor für die DNA-Bindungsstelle in der RNAP, zerstört, wie erwartet, bei Zugabe von zehnfach überstöchiometrischen Mengen sämtliche Coreenzym-DNA - Komplexe (Abb. 1, Spur 8).

Abb.1

Titration des A1-Fragments mit steigenden Mengen Coreenzym

$C_{DNA} = 1.2 \mu M$, die Komplexbildung war wie in II.6.1 beschrieben
Die Stöchiometrieverhältnisse Coreenzym : DNA sind:

Spur 1: 0.33 : 1

Spur 2: 0.5 : 1

Spur 3: 0.66 : 1

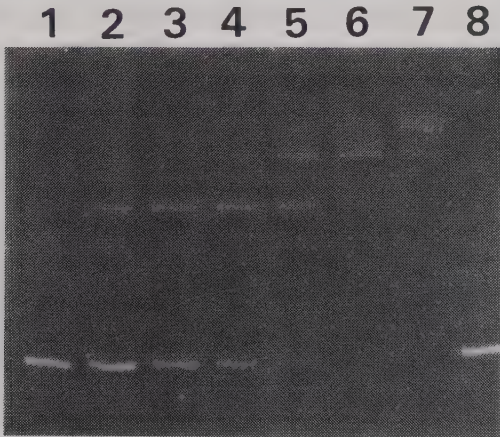
Spur 4: 1 : 1

Spur 5: 1.5 : 1

Spur 6: 2 : 1

Spur 7: 3 : 1

Spur 8 zeigt den gleichen Coreenzym-DNA - Komplex wie in Spur 7, jedoch nach Zugabe von zehnfach stöchiometrischem Überschuß an Heparin (im Vergleich zum Enzym).



III.2.1.2. Titration von Coreenzym-DNA - Komplex mit steigenden Mengen σ -Faktor

In III.2.1.1. wurde gezeigt, daß Coreenzym-DNA - Komplexe in nicht-denaturierenden Gelen deutliche Komplexbanden ergeben. Das ermöglichte es, den Übergang von Coreenzym-DNA- zu Holoenzym-DNA - Komplexen quantitativ zu untersuchen. Zur bestmöglichen Rekonstitution von Holoenzym aus Coreenzym und σ -Faktor (beide wurden getrennt gereinigt, siehe II.1. und II.2.) wurden die optimalen Stöchiometrien ermittelt.

Coreenzym-DNA - Komplexe, die aus 6 pmol Coreenzym und 12pmol DNA gebildet waren, gingen nach Zugabe von steigenden Mengen σ -Faktor quantitativ in Holoenzym-DNA - Komplexe über, allerdings waren dazu dreifach überstöchiometrische Mengen an σ -Faktor notwendig (siehe Abb. 2b und d). Ein abortiver Transkriptionsansatz zeigte, daß die Produktion von pppApU aus ATP und UTP parallel mit der Ausbildung des Holoenzym-DNA - Komplexes verläuft (Abb. 2d).

Abb. 2

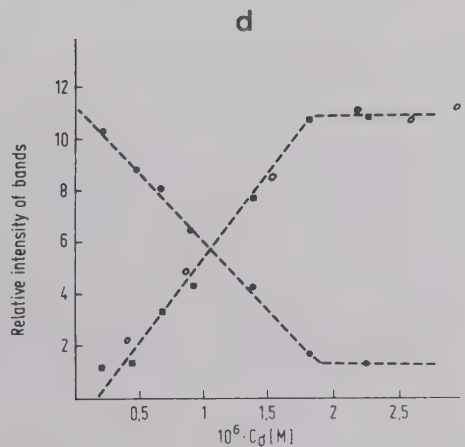
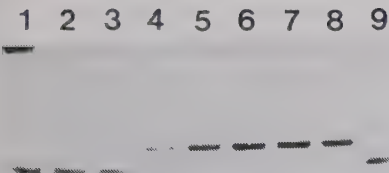
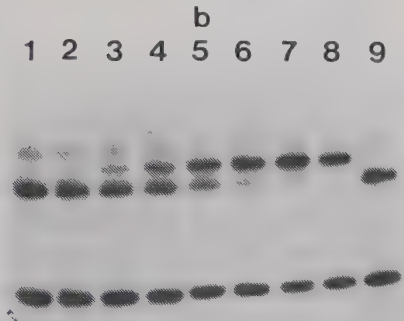
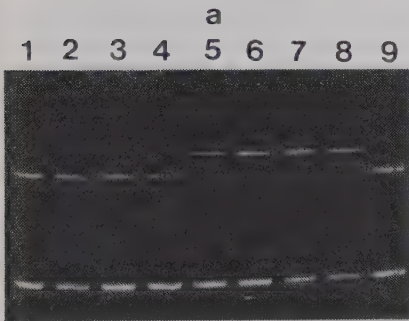
Titration von Coreenzym-DNA - Komplex mit steigenden Mengen σ -Faktor

$C_{DNA} = 1.2\mu M$; $C_{Core} = 0.63\mu M$; die Konzentrationen des σ -Faktors variierten in Spur 1 - 7 wie in d angegeben.

In Spur 8 ist der gleiche Ansatz zu sehen wie in Spur 7, jedoch mit zehnfach stöchiometrischem Überschuß an Heparin im Vergleich zum Enzym.

Spur 9 zeigt Coreenzym-DNA - Komplex ohne Zugabe von σ

- a) EtBr-gefärbtes Gel
- b) Autoradiogramm der ^{32}P -markierten DNA-Fragmente
- c) Coomassie-Blue-gefärbtes Gel
- d) Quantifizierung der verschiedenen Komplexe in b)
 - Abnahme des Core-DNA - Komplexes
 - Zunahme des Holoenzym-Promotor - Komplexes
 - pppApU Produktion im abortiven Transkriptionsansatz



III.2.1.3. Stöchiometrie zwischen Holoenzym und A1-DNA-Fragment

Die Stöchiometrie zwischen Holoenzym und A1-Fragment, der Einfluß von Heparin auf spezifisch und unspezifisch gebundene RNA-Polymerase - DNA - Komplexe und der Ausschluß von EtBr durch die verschiedenartigen Komplexe wurden im nicht-denaturierenden Gel untersucht.

Holoenzym, entsprechend den unter III.2.1.2. erhaltenen Ergebnissen mit einem Überschuß an σ -Faktor rekonstituiert, wurde in steigenden Mengen mit DNA-Fragmenten in konstanten Konzentrationen (12 pmol) gemischt (Abb. 3). Zwei Besetzungszustände mit einem bzw. zwei Polymerasemolekülen pro DNA-Fragment traten nacheinander auf. Nach Zugabe von Heparin war jedoch nur noch die erste Bindung im nicht-denaturierenden Gel stabil, die Bande, die der Zweifachbesetzung entsprach, verschwand völlig. Diese Tatsache spricht dafür, daß nur die erste Besetzung der Promotor-DNA durch RNAP in der Lage ist, in einen spezifischen heparinstabilen, offenen Komplex (Schäfer et al., 1973) überzugehen.

Verglich man die Schwärzung des Autoradiogramms als Maß für die DNA-Menge mit der Menge des interkalierten EtBr bei den gleichen DNA- und Komplexbanden, zeigte sich, daß durch die Bindung des ersten Polymerasemoleküls die EtBr-Interkalation um 60% abnahm. Die zusätzliche Bindung eines zweiten RNAP-Moleküls führte zu einer Gesamtabnahme von 85%. Diese Tatsache bestätigt, daß ein qualitativer Unterschied zwischen der Bindung des ersten und des zweiten Polymerasemoleküls bestehen muß. DNase I-Protektionsexperimente des binären Komplexes (Carpousis und Gralla, 1985; Straney und Crothers, 1985; Spassky, 1986) zeigen, daß beim *lac* UV 5-Promotor ungefähr 70 Basenpaare von der Polymerase bedeckt werden. Bei vollständigem Ausschluß von EtBr bedeutete dies, auf unser Promotorfragment übertragen, eine Abnahme von 54% der EtBr-Interkalation. Eigene, durch Exonuklease III-"footprints" erhaltene Daten (siehe III.4.3., Abb. 14), zeigen eine Bedeckung von ca. 64 bp, das entspräche einer Abnahme der EtBr-Interkalation um 49%.

Abb. 3

Titration von DNA-Fragment mit steigenden Mengen Holoenzym

$C_{DNA} = 0.59 \mu M$

a) EtBr-gefärbtes Gel

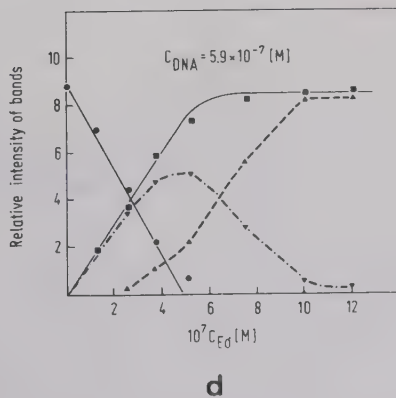
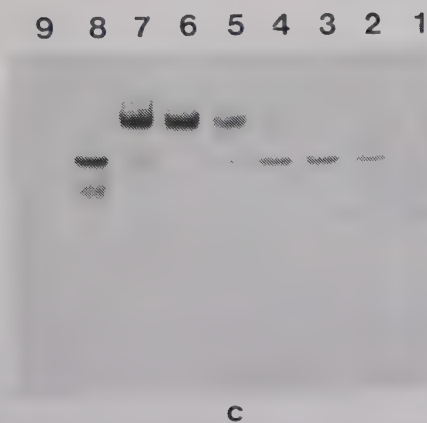
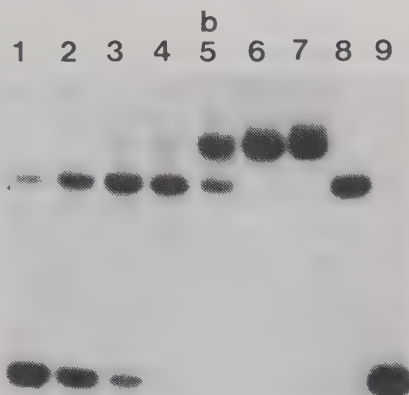
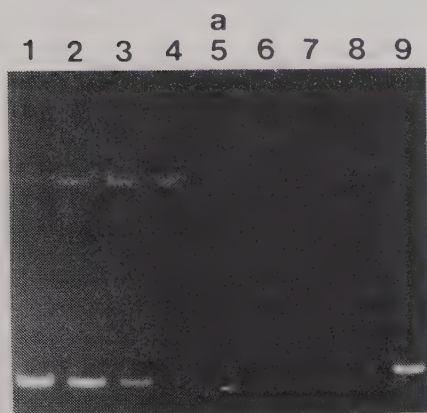
b) Autoradiogramm der ^{32}P -markieren DNA

c) Coomassie-Blue-gefärbtes Gel

In den Spuren 1 bis 7 variiert die Holoenzymkonzentration wie in d angegeben ($1.5 \cdot 10^{-7}$ bis $12 \cdot 10^{-7} M$)

Spur 8 zeigt den gleichen Ansatz wie Spur 7, jedoch mit zehnfachem Überschuß an Heparin (im Vergleich zur RNA-Polymerase). In Spur 9 ist die freie DNA zu sehen.

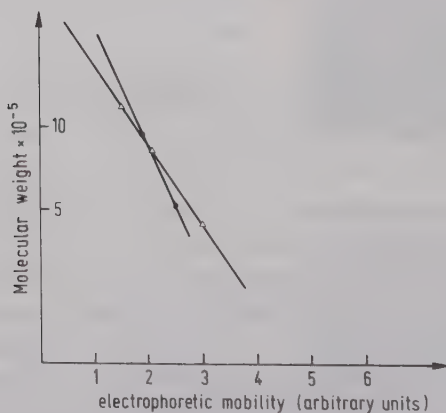
- d) ● Abnahme der freien DNA in b
 ▼ Verteilung des Holoenzym-DNA- 1:1 Komplexes
 ▲ Verteilung des Holoenzym-DNA- 2:1 Komplexes
 ■ Gesamtmenge aller Komplexe



Trägt man die Laufstrecken der einfach, zweifach und dreifach besetzten Coreenzym-DNA - Komplexe gegen den Logarithmus des Molekulargewichts auf, so liegen alle drei Punkte auf einer Geraden (Abb. 4). Der monomere Holoenzym-DNA - Komplex hingegen läuft gegenüber seinem Molekulargewicht deutlich verzögert. Da die Ladung der σ -Untereinheit nicht für diesen Laufunterschied verantwortlich sein kann (σ ist die am negativsten geladene Untereinheit der RNAP), muß eine Konformationsänderung des Holoenzym-DNA - Komplexes im Vergleich zum Coreenzym-DNA - Komplex diesen Laufunterschied bewirken.

Abb. 4

Elektrophoretische Beweglichkeit von Δ Coreenzym-DNA - Komplexen (Monomer, Dimer, Trimer) im Vergleich zu $\bullet$ Holoenzym-DNA - Komplexen (Monomer, Dimer) im nicht-denaturierenden Acrylamidgel



III.2.2. Einfluß von Temperatur und Ionenstärke auf binäre Holoenzym-DNA - Komplexe

Die Salz- und Temperaturbedingungen für eine optimale Ausbeute und Stabilität von binärem Komplex wurden im Hinblick auf die folgenden Transkriptionsversuche etabliert. Promotor-RNAP - Komplexe wurden standardmäßig in Mittelsalzbedingungen (50mM NaCl, 8mM Tris/HCl pH 7.9) gebildet, da bei noch niedrigeren Ionenstärken (8mM Tris/HCl) das Enzym nicht mehr stabil ist und Coreenzym und σ getrennt an die DNA binden. Ist aber einmal ein spezifischer Komplex ausgebildet, stabilisieren Niedrigsalzbedingungen (8mM Tris/HCl, eingestellt durch eine Dialyse auf Millipore-Filterplättchen) den binären Komplex gegen Temperaturerniedrigungen und Heparineinfluß. Setzt man den bei Mittelsalzbedingungen (50mM NaCl/8mM Tris/HCl) gebildeten Komplex vor der Dialyse verschiedenen Temperaturen (37°, 20°, 14°, 8°, 4° C) aus, so beobachtet man eine deutliche, temperaturbedingte Abnahme des binären Komplexes (Abb. 5). Die Zunahme einer verschmierten Bande, die auf Höhe der Coreenzym-DNA - Komplexbande läuft und die Tatsache, daß diese Bande heparinsensitiv ist, deuten auf Dissoziation des σ -Faktors bei sinkender Temperatur hin.

Abb. 5 (nächste Seite)

Temperaturabhängigkeit des Holoenzym-Promotor - Komplexes

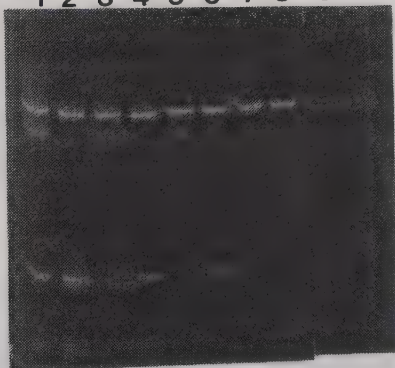
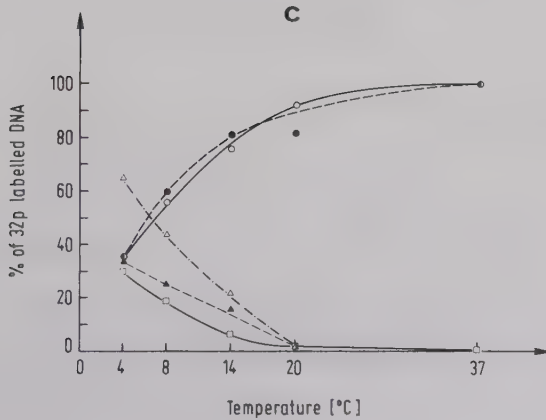
Holoenzym(13.3pmol) - DNA(12.5 pmol) - Komplexe wurden bei 37° C in 8mM Tris/HCl pH 7.9, 50mM NaCl ausgebildet und anschließend bei 4° C (Spur 1 und 2), 8° C (Spur 3 und 4), 14° C (Spur 5 und 6), 20° C (Spur 7 und 8), 37° C (Spur 9 und 10) für je 40 min inkubiert. Nach Dialyse gegen 8mM Tris/HCl pH 7.9 bei 25° C wurden zu den Proben der Spuren 2, 4, 6, 8 und 10 je zehnfach überstöchiometrische Mengen an Heparin (im Vergleich zum Enzym) gegeben.

- a) Autoradiogramm der mit ^{32}P -markierten DNA
- b) EtBr-Färbung des gleichen Gels
- c) Quantifizierung der Radioaktivität der einzelnen Banden aus a (die Gesamtradioaktivität jeder Spur wurde auf 100% gesetzt).
 ○ (mit Heparin) und ● (ohne Heparin) repräsentieren die Ausbeute an binärem 1:1 Holoenzym-DNA - Komplex bei den entsprechenden Temperaturen.
 Δ (mit Heparin) und □(ohne Heparin) geben die Mengen an freier DNA an.
 ▲ gibt die Differenz zwischen der freien DNA, mit und ohne Heparin, und somit ein Maß für die Menge an nicht heparin-stabilen Komplexen an.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

**a**

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

**b****c**

III.2.3. Bildung von ternären Komplexen als Vorversuch für die Erzeugung definierter Transkriptionsstadien

Durch Zugabe der zwei oder drei ersten Ribonukleosidtriphosphate (ATP, UTP; bzw. ATP, UTP, CTP) zum binären Komplex wurden abortive Transkriptionskomplexe (McClure et al., 1978) gebildet. Diese Komplexe zeigten nach Auftrag auf ein nicht-denaturierendes Acrylamidgel die gleichen Laufeigenschaften wie binärer Komplex, jedoch mit einer leicht gesteigerten Sensitivität gegenüber Heparin (Abb. 6a). Als abortive Produkte entstanden die erwarteten pppApU bzw. pppApUpC (Abb. 6b,c). Diese kurzen RNA-Produkte dissoziieren vom Komplex ab und wandern im Gel stets getrennt von der Komplexbande.

Eine deutliche Änderung der elektrophoretischen Mobilität der Transkriptionskomplexe ergab sich, nachdem mit allen vier Triphosphaten initiiert wurde. Die Überprüfung dieser ausgeschnittenen ternären Komplexe auf einem SDS-Gel ergab, daß sie keine σ -Untereinheit enthielten (Abb. 6d). Ein Teil der radioaktiv markierten RNA-Produkte wandert mit dieser Komplexbande, was beweist, daß sie an den ternären Komplex gebunden sind. Der Rest der RNA läuft als separate Bande und ist weder mit DNA noch mit Protein assoziiert. Nach Elution der komplexgebundenen wie der freien RNA aus dem nicht-denaturierenden Gel zeigte sich, daß beide RNA-Stücke gleich lang sind und die Länge des "run-off"-Transkripts haben. Die komplexgebundene RNA besteht zusätzlich noch aus einem 4-5 Nukleotide kürzeren RNA-Produkt (Abb. 6c).

Abb. 6 (nächste Seite)

Analyse von ternären Komplexen

a) EtBr-gefärbtes Gel

b) Autoradiogramm der mit $\alpha^{32}\text{P}$ -UTP markierten Produkte im gleichen Gel

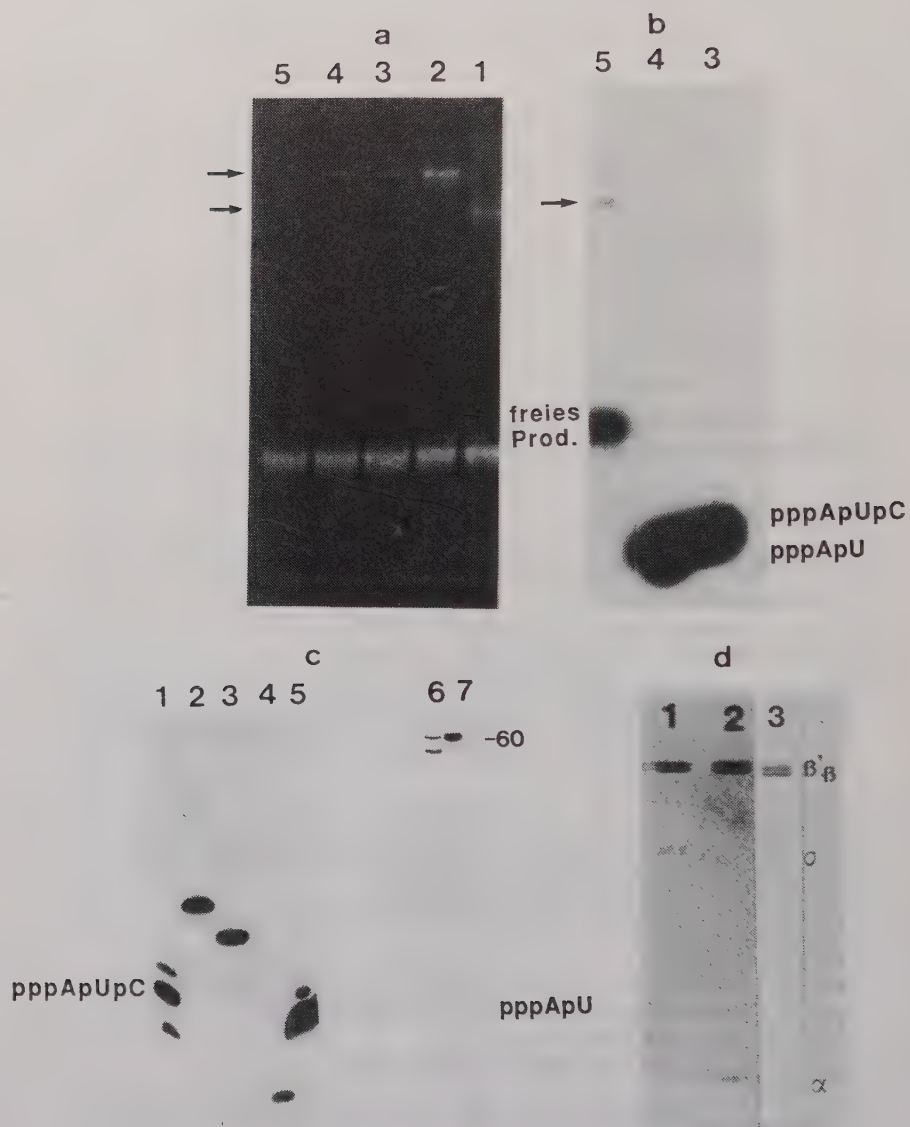
- Spur 1: Coreenzym-DNA - Komplex
- Spur 2: Binärer Holoenzym-DNA - Komplex
- Spur 3: Holoenzym-DNA - Komplex nach Zugabe von ATP, UTP, CTP
- Spur 4: Holoenzym-DNA - Komplex nach Zugabe von ATP, UTP
- Spur 5: Holoenzym-DNA - Komplex nach Zugabe aller vier Triphosphate

c) Analyse der in b erkennbaren Produkte auf Sequenzgelen

- Spur 1: Produkt, das aus Spur 3(b) eluiert wurde (pppApUpC)
- Spur 2: DNA-Standard, acht Nukleotide
- Spur 3: DNA-Standard, sechs Nukleotide
- Spur 4: $\alpha^{32}\text{P}$ -CTP
- Spur 5: Produkt, das aus Spur 4(b) eluiert wurde (pppApU)
- Spur 6: RNA-Produkt, das an den ternären Komplex in Spur 5(b) gebunden war (Pfeil!)
- Spur 7: freies RNA-Produkt aus Spur 5(b)

d) Analyse der Untereinheiten der A1-RNAP - Komplexe in Spur 5(a)

- Spur 1: Obere Komplexbande (binärer Komplex)
- Spur 2: Untere Komplexbande (ternärer Komplex)
- Spur 3: Referenz, Untereinheitenzusammensetzung von Holoenzym



III.3. Versuche Transkriptionsstadien mit RNA-Produkten definierter Länge "einzufrieren"

In unterschiedlichen Rastern "eingefrorene" Transkriptionsstadien wurden folgendermaßen erhalten (die Gründe hierfür wurden schon unter III.1.1. diskutiert): Durch Zugabe von ApUpC, GTP, ATP bzw. ApUpC, GTP, ATP, CTP zum Transkriptionsansatz wurden an der A1-Promotorsequenz als Matrize stabile ternäre Komplexe mit Produkten von 11 bzw. 20 Nukleotiden Länge erzeugt.

In Abb. 8 ist das Gelbild des entsprechenden Experiments zu sehen; es zeigt, daß die ternären Komplexe ausschließlich das Produkt mit der erwarteten Länge enthalten. Durch die Vorgehensweise wird deutlich, daß die RNA tatsächlich stabil an den RNAP-DNA - Komplex gebunden ist. Die Proben wurden nach Beendigung der Transkription (siehe II.6.2) auf ein nicht-denaturierendes Acrylamidgel aufgetragen (Abb. 7). Anschließend wurden nur die Banden der ternären Komplexe ausgeschnitten und die daran gebundene RNA eluiert. Nur diese Produkte wurden in Abb. 8 analysiert.

Abb. 7

Binäre und ternäre Komplexe im nicht denaturierenden Gel

In allen Komplexen ist die DNA markiert, die ternären Komplexe wurden zusätzlich mit markiertem ApUp*C angesetzt.

Bei der Transkription bis zum elften Nukleotid wurden ApUpC, GTP, ATP gleichzeitig mit den binären Komplexen gemischt. Der Ansatz wurde für 40 min bei 37° C inkubiert. Bei der Transkription bis zum zwanzigsten Nukleotid wurden ApUpC, GTP und ATP mit dem binären Komplex gemischt und der Ansatz 10 min bei 37° inkubiert. Erst dann wurde CTP hinzugegeben und nochmals 30 min inkubiert.

Spur 1, 3, 5 zeigen Komplexe, die mit dem 130 bp-A1-Fragment angesetzt wurden.

Spur 2, 4, 6 zeigen Komplexe, die mit einem 18 bp kürzeren, Ava II-nachgeschnittenen A1-Fragment angesetzt wurden.

Spur 1 und 2: Binärer Komplex

Spur 3 und 4: Ternärer Komplex im 11er-Raster

Spur 5 und 6: Ternärer Komplex im 20er-Raster

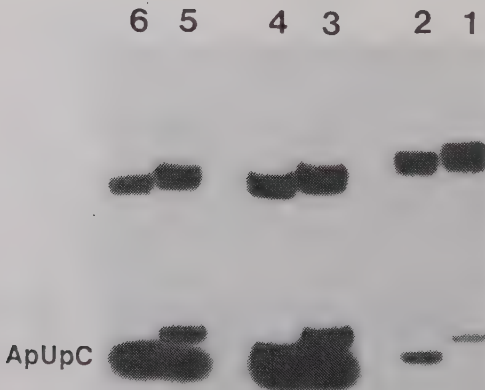
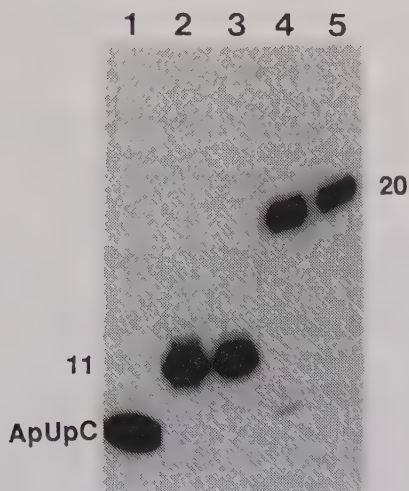


Abb. 8

Produkte der ternären Komplexe aus Abb. 7

- Spur 1: ApUp*C
 Spur 2 und 3: Eluierte Produkte der Komplexe aus Spur 3 und 4, Abb. 7 (11er)
 Spur 4 und 5: Eluierte Produkte der Komplexe aus Spur 5 und 6, Abb. 7 (20er)

Die ungewöhnlich kurze Laufstrecke des ApUpC im Vergleich zum 11er- bzw. 20er-Nukleotid erklärt sich durch den bei diesem sehr kurzen Oligonukleotid dominanten Einfluß der Ladung auf die Laufgeschwindigkeit.



III.3.1. Erzeugung von RNA-Produkten mit 12 bzw. 21 Nukleotiden Länge mit Hilfe von O-Methyl - Stopnukleotiden

Nachdem sich gezeigt hatte, daß es möglich war an der A1-Matrize ternäre Komplexe in zwei definierten Stadien "einzufrieren", sollte das Netz der Raster dichter gelegt werden, zunächst durch Verwendung von O-Methyl - Stopnukleotiden zusätzlich zu ApUpC, GTP, ATP bzw. ApUpC, GTP, ATP, CTP.

Abb. 9 zeigt den Unterschied vom 12er- bzw. 21er- zu den 11er- bzw. 20er-Stadien. Die Spezifität der mit O-Methyl - NTPs erzeugten Produkte ist ähnlich der, ohne Stopnukleotide erhaltenen, jeweils um ein Nukleotid kürzeren Produkte.

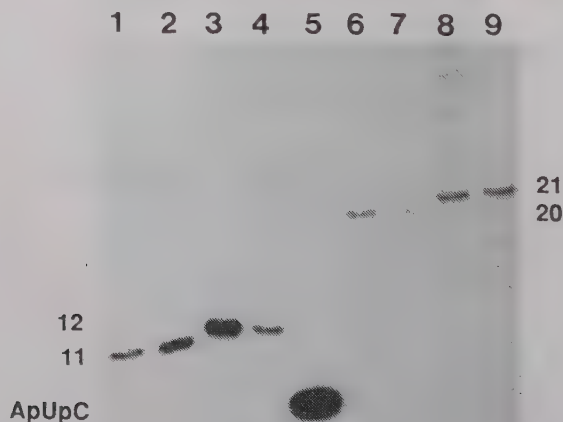
Abb. 9

Vergleich der 11er- und 20er- mit den 12er- bzw. 21er-Produkten

Das 12er-Nukleotid wurde erhalten: Mischen von binärem Komplex mit ApUpC, GTP, ATP; 10 min 37° C; Zugabe von O-M - CTP (Endkonz. 10^{-5} M); weitere 30 min bei 37°.

Das 21er-Nukleotid wurde erhalten: Mischen von binärem Komplex mit ApUpC, GTP, ATP; 10 min 37° C; Zugabe von CTP, O-M - UTP (Endkonz. 10^{-5} M); weitere 30 min bei 37°.

Spur 1 und 2:	11er-Produkt
Spur 3 und 4:	mit O-Methyl - CTP erzeugtes 12er-Produkt
Spur 5:	ApUpC
Spur 6 und 7:	20er-Produkt
Spur 8 und 9:	mit O-Methyl - UTP erzeugtes 21er-Produkt



III.3.2. Verwendung von mutierten Promotorsequenzen

Die Verwendung von O-Methyl - Stopnukleotiden ermöglichte eine Erweiterung der Raster um jeweils nur ein Nukleotid. Außerdem eigneten sich Transkriptionsstadien, die mit Stopnukleotiden erzeugt wurden, nicht in allen Fällen für den Verdau mit Exonuklease III, wie später gezeigt wird. Deshalb wurde die A1-Sequenz gezielt mutiert, um eine genügend große Zahl unterschiedlicher Transkriptionskomplexe, die in definierten Rastern "eingefroren" werden konnten, zu erhalten.

Mehrere mutierte Sequenzen wurden wie unter II.4.2. und II.4.3. beschrieben, kloniert und gereinigt. Angegeben sind jeweils nur die Sequenzen zwischen der Pos. +1 und dem ersten T (Pos. +21 bei A1) im nicht-codogenen Strang (die zwischen +11 und +12 eingefügten Sequenzen sind durch Fettdruck hervorgehoben):

M I:

ATCGAGAGGGA**AAGAGGC**ACGGCGAAT (16; 25)

M II:

ATCGAGAGGGA**AAGAGAGAGGC**ACGGCGAAT (20; 29)

M III:

ATCGAGAGGGA**AAGAGAGAGAGAGGC**ACGGCGAAT (24; 33)

M IV:

ATCGAGAGGGA**AAGAGAAGAGAGAGAGGC**ACGGCGAAT (27; 36)

M V:

ATCGAGAGGGA**AAGAGAAGAAGAGAGAGAGGC**ACGGCGAAT (30; 39)

In Klammern hinter den Sequenzen sind jeweils die Längen der Transkripte, die nach Initiation mit ApUpC, GTP, ATP bzw. ApUpC, GTP, ATP, CTP entstehen, angegeben. Die Mutationen wurden unter folgenden Gesichtspunkten gewählt:

a) Änderungen in der Wildtypsequenz sollten so weit wie möglich stromabwärts gesetzt werden, um eventuelle Effekte auf die Transkriptionsrate, wie sie von Kammerer et al., (1986) beschrieben wurden, möglichst auszuschließen.

b) Die Mutationen sollten sowohl durch Initiation mit ApUpC, GTP, ATP als auch mit ApUpC, GTP, ATP, CTP neue Rasterungsmöglichkeiten eröffnen, so daß letztlich, unter Berücksichtigung der unter a) aufgestellten Forderung, ein Einschub von G,A-Sequenzen vor dem ersten C an Pos. +12 am sinnvollsten erschien.

c) Die Sequenzen der mutierten DNA-Fragmente waren so konzipiert, daß sie mindestens eine Mbo II-Erkennungssequenz (GAAGA) zur schnelleren Überprüfung der richtigen Klone enthielten.

d) Die Längen der eingefügten Sequenzen wurden so gewählt, daß die möglichen Transkriptionsraster eine ausreichende Breite an Stadien abdeckten (11 bis 39), andererseits aber auch Vergleiche ähnlicher oder identischer Stadien, die durch Initiation mit ApUpC, GTP, ATP bzw. mit ApUpC, GTP, ATP, CTP erzeugt wurden, lieferten (A1 20 und M II 20; M I 25 und M III 24; M II 29 und M V 30).

Mit den mutierten Sequenzen wurden die gleichen Transkriptionsversuche, wie die unter III.3 für die A1-Wildtypsequenz beschrieben, durchgeführt.

Abb. 10 a und 10 b zeigen, daß auch an den mutierten Sequenzen spezifische Transkription bis in die jeweiligen Raster möglich ist. Die Wahl der Triphosphatkonzentrationen ist allerdings ein kritischer Punkt. Zu niedrige Konzentrationen können zu vorzeitigem Abbruch der RNA-Kette führen, zu hohe Konzentrationen zu einem "Durchlesen" über den vorgesehenen Stoppunkt hinaus. Das zeigte sich bei der Erzeugung der Stadien M II 20, M IV 27, M V 30 und M II 29, bei der eine höhere Triphosphatkonzentration ($5 \cdot 10^{-4} \text{M}$ Endkonz.) als in den übrigen Ansätzen verwendet wurde. Das führte zu einem "Durchlesen" eines gewissen Teils der RNAP bis zum nächstfolgenden C oder T. Vermutlich sind auch bei hochgereinigten Triphosphaten nie ganz zu vermeidende Verunreinigungen mit anderen NTPs dafür verantwortlich. Derselbe Effekt wurde auch von Levin et al. (1987) beobachtet.

Bei einigen der verwendeten Mutationen (M I und M III) wurden außer den Transkriptionsansätzen mit ApUpC, GTP, ATP bzw.

ApUpC, GTP, ATP, CTP zusätzlich noch, wie unter III.2.1., Ansätze unter Verwendung von O-Methyl - Stopnukleotiden gemacht. Es sollten Transkripte von folgenden Längen erzeugt werden: 17 bzw. 26 (M I), 25 bzw. 34 (M III).

In Abb. 10 c ist das Ergebnis zu sehen; die Transkripte, die mit Hilfe von ApUpC, GTP, ATP, O-M-CTP erzeugt wurden, sind alle im richtigen Raster, die mit ApUpC, GTP, ATP, CTP, O-M-UTP erzeugten Produkte bestehen auch aus RNAs, die nicht die erwartete Länge haben.

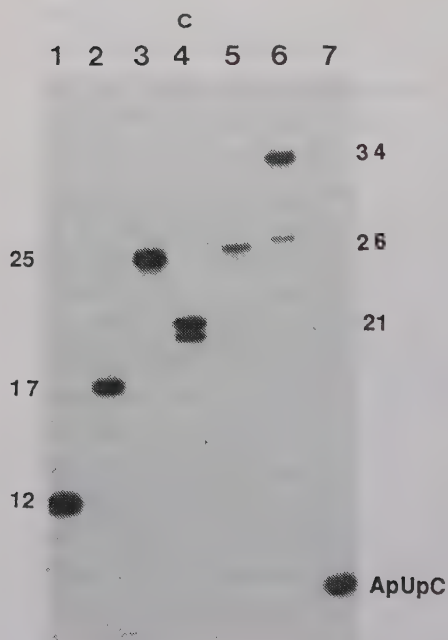
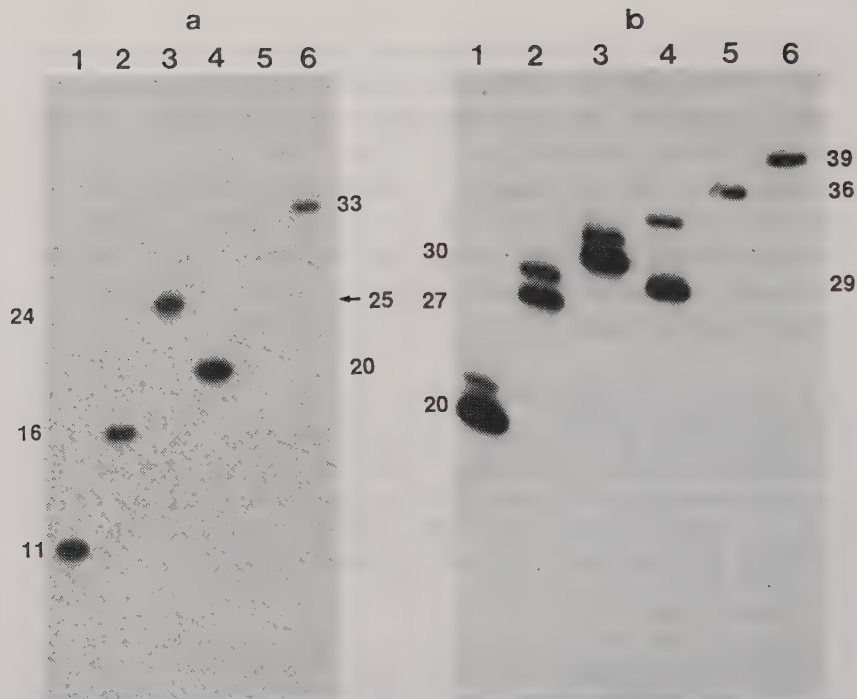
Abb. 10 (nächste Seite)

Produkte ternärer Komplexe, die mit A1-Fragment und den Mutationen I bis V erhalten wurden. (A1 bezeichnet die Wildtypsequenz, M I-V die mutierten Sequenzen, wie sie unter III.3.2 erwähnt wurden. Die Zahl dahinter gibt die Länge der Produkte der jeweiligen Komplexe in Nukleotiden an)

- a) Spur 1: A1 11
 Spur 2: M I 16
 Spur 3: M III 24
 Spur 4: A1 20
 Spur 5: M I 25 (Pfeil)
 Spur 6: M III 33
- b) Spur 1: M II 20
 Spur 2: M IV 27
 Spur 3: M V 30
 Spur 4: M II 29
 Spur 5: M IV 36
 Spur 6: M V 39

A1 11, M I 16, M II 20, M III 24, M IV 27, M V 30 wurden erhalten durch Zugabe von ApUpC, GTP, ATP zum binären Komplex; A1 20, M I 25, M II 29, M III 33, M IV 36, M V 39 durch Zugabe von ApUpC, GTP, ATP, CTP.

- c) Die Raster A1 12, M I 17, M III 25 wurden mit ApUpC, GTP, ATP, O-Methyl - CTP; A1 21, M I 26, M III 34 mit ApUpC, GTP, ATP, CTP, O-Methyl - UTP erhalten.
- Spur 1: A1 12
 Spur 2: M I 17
 Spur 3: M III 25
 Spur 4: A1 21
 Spur 5: M I 26
 Spur 6: M III 34
 Spur 7: ApUp*C



III.4. Einfluß von Exonuklease III und von Pyrophosphat auf die Stabilität ternärer Komplexe; Exonuklease III-"footprints"

Die Bildung stabiler ternärer Komplexe in definierten Rastern war die Voraussetzung für die Versuche, mit Exonuklease III die geschützten DNA-Bereiche in den einzelnen Transkriptionsstadien zu bestimmen.

III.4.1. Einfluß von Exonuklease III auf die Produkte ternärer Komplexe

Für die Versuche zur Charakterisierung der durch die RNA-Polymerase bedeckte DNA-Region mit Exonuklease III war es notwendig, den Einfluß des Exo III-Verdau auf die ternären Komplexe zu überprüfen.

Es zeigte sich, daß es ein paar Komplexstadien gibt, deren Produkte unter Einfluß von Exo III vom 3'-Ende her abgebaut wurden. Das kann durch eine Rückreaktion der Transkription erklärt werden. Komplexe in anderen Rastern wie A1 11; M I 16; M IV 27; M V 30; A1 20; M I 25; M II 29; M III 33; M IV 36; M V 39 zeigen wenig oder keine Reaktion auf Exo III-Exposition (Abb. 11 a und b).

Immer instabil gegen Exo III-Verdau waren die Produkte von M II 20, nur manchmal instabil waren die von M III 24, ohne daß ein Zusammenhang zwischen eventuell leicht wechselnden Versuchsbedingungen und der unterschiedlichen Stabilität hergestellt werden konnte. Wie sich später zeigen wird (III.4.5.), drückt sich eine Instabilität der Produkte gegenüber Exo III auch im Protektionsmuster aus.

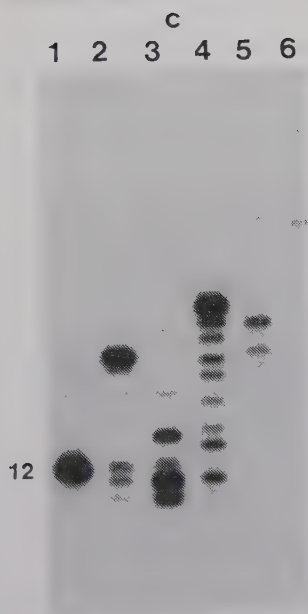
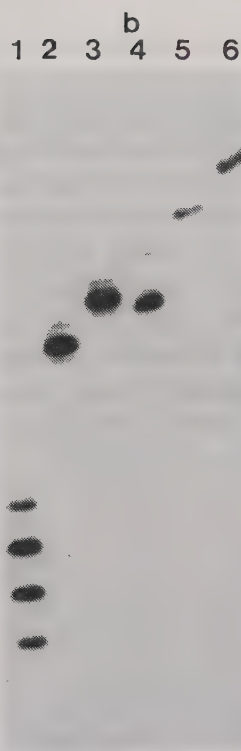
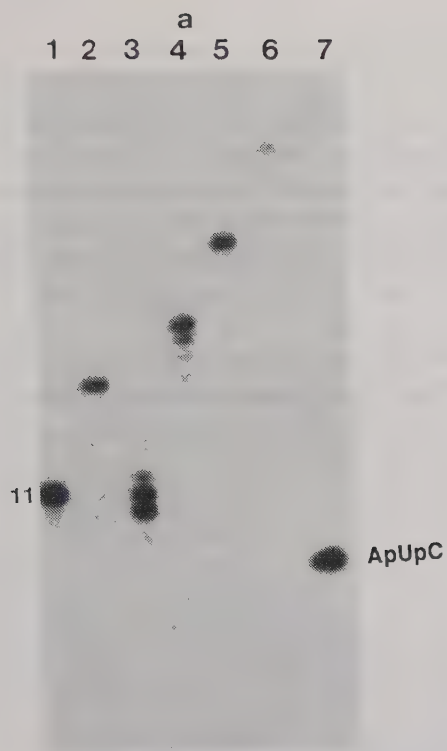
Ternäre Komplexe, die mit Hilfe von O-Methyl - Nukleotiden erzeugt wurden (M I 17; M III 25; A1 21; M I 26; M III 34), zeigen gegenüber den um jeweils ein Nukleotid kürzeren Stadien, die ohne Stopnukleotide erzeugt wurden, eine deutlich erhöhte Instabilität gegenüber Exo III-Verdau (siehe Abb.11 c). Aus diesem Grund wurde darauf verzichtet, Raster die mit O-Methyl - Nukleotiden erhalten wurden für die Exo III-"footprinting"-Versuche heranzuziehen.

Abb. 11 (nächste Seite)

Einfluß von Exo III auf die Produkte ternärer Komplexe

a, b, c zeigen jeweils die gleichen Transkriptionsprodukte wie sie in Abb. 10 zu sehen sind, jedoch nach Exo III-Verdau.

- a) Spur 1: A1 11
Spur 2: M I 16
Spur 3: M III 24 (instabil)
Spur 4: A1 20
Spur 5: M I 25
Spur 6: M III 33
Spur 7: ApUp*C
- b) Spur 1: M II 20 (instabil)
Spur 2: M IV 27
Spur 3: M V 30
Spur 4: M II 29
Spur 5: M IV 36
Spur 6: M V 39
- c) Spur 1: A1 12
Spur 2: M I 17
Spur 3: M III 25 (instabil)
Spur 4: A1 21 (leicht instabil)
Spur 5: M I 26 (instabil)
Spur 6: M III 34 (instabil)



III.4.2. Einfluß von Pyrophosphat auf ternäre Komplexe

Der Einfluß von Exonuklease III auf die Produkte einiger Transkriptionsstadien ähnelt stark der Wirkung von Pyrophosphat, wie sie zuerst von Rozovskaya et al., (1981) beobachtet wurde. Es wurden deshalb verschiedene ternäre Komplexe (A1 11; M I 16; M III 24; A1 20; M I 25; M III 33) mit Pyrophosphat inkubiert. Man erhält einen Abbau der Produkte in allen untersuchten Rastern (Abb. 12).

Die kürzesten Produkte, die sowohl bei den Exonuklease III-instabilen Stadien, als auch nach Pyrophosphorolyse noch stabil an die ternären Komplexe gebunden bleiben, sind zehn Nukleotide lang (Abb. 11 und 12).

Abb. 12

Einfluß von Pyrophosphat auf die Produkte ternärer Komplexe
 Ternäre Komplexe (A1 11; M I 16; M III 24; A1 20; M I 25; M III 33)
 wurden mit Pyrophosphat (Endkonz. $10^{-2}M$) für 40min bei $37^{\circ}C$
 inkubiert. Die Proben wurden auf ein nicht-denaturierendes Gel
 aufgetragen, die Komplexbanden ausgeschnitten und eluiert und die
 RNA auf einem 20%igen Acrylamidgel analysiert.

- | | |
|----------|------------------------------------|
| Spur 1: | A1 11 |
| Spur 2: | M I 16 |
| Spur 3: | M III 24 |
| Spur 4: | A1 11 nach PP |
| Spur 5: | M I 16 nach PP |
| Spur 6: | M III 24 nach PP |
| Spur 7: | RNA-Referenz 11, 16, 24 Nukleotide |
| Spur 8: | A1 20 |
| Spur 9: | M I 25 |
| Spur 10: | M III 33 |
| Spur 11: | A1 20 nach PP |
| Spur 12: | M I 25 nach PP |
| Spur 13: | M III 33 nach PP |

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13



III.4.3. Exonuklease III-"footprinting"-Experimente

Der Versuchsablauf für die Exonuklease III-"footprinting"-Experimente ternärer Komplexe in definierten Rastern sah folgendermaßen aus:

1. Ausbilden von binären Komplexen aus RNAP und DNA-Fragmenten (A1; M I bis M V). Die DNA-Fragmente waren an beiden 5'-Enden mit ^{32}P markiert.
2. Start der RNA-Synthese durch Zugabe des Startertrinukleotids ApUpC und GTP, ATP bzw. GTP, ATP, CTP. Die RNA-Ketten waren nahe ihrem 5'-Ende durch Verwendung von ^{32}P -markiertem ApUp*C markiert.
3. Abbau mit Exonuklease III.
4. Reinigung der Exonuklease III-verdauten Komplexe über nicht-denaturierende Acrylamidgele (siehe Abb. 13). Die Komplexe ergaben auch nach dem Abbau stabile Banden im Gel. Dieser Reinigungsschritt erleichterte die Interpretation, weil so nur die komplexgebundene DNA und die komplexgebundenen RNA-Produkte analysiert wurden.
5. Ausschneiden der Komplexbanden und Elution der DNA und RNA.
6. Auftrag der eluierten DNA und RNA auf Sequenzgele und Analyse der Bandenmuster.

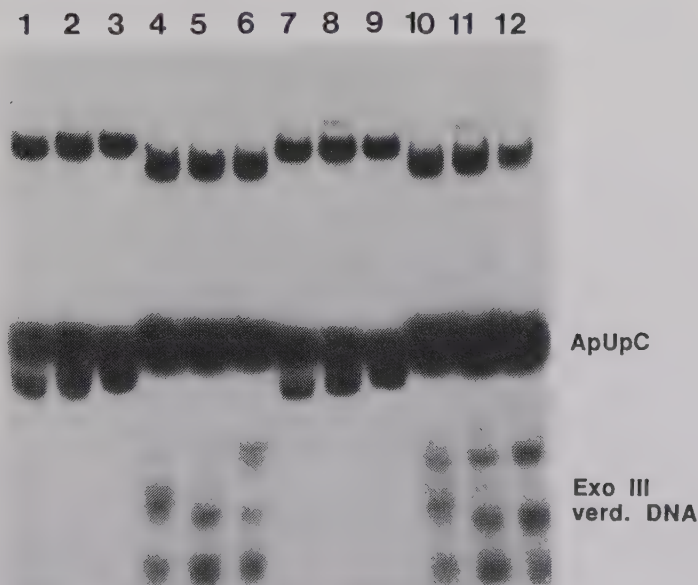
Voraussetzung für eine aussagekräftige Interpretation der Protektionsmuster war, daß die untersuchten ternären Komplexe tatsächlich in den gewünschten Rastern waren, deshalb erfolgte bei jedem Versuch eine Kontrolle der RNA-Produkte nach dem Exo III-Verdau .

Abb. 13

Vergleich von Exo III-verdauten ternären Komplexen verschiedener Transkriptionsstadien mit unverdauten im nicht-denaturierenden Acrylamidgel

Ternäre Komplexe in folgenden Rastern: A1 11, M I 16, M III 24, A1 20, M I 25, M III 33, wurden ohne bzw. nach Exo III-Verdau auf ein nicht-denaturierendes Gel aufgetragen. Sowohl die DNA als auch die RNA waren mit ^{32}P markiert.

Spur 1: A1 11
 Spur 2: M I 16
 Spur 3: M III 24
 Spur 4: A1 11 nach Exo III-Verdau
 Spur 5: M I 16 nach Exo III-Verdau
 Spur 6: M III 24 nach Exo III-Verdau
 Spur 7: A1 20
 Spur 8: M I 25
 Spur 9: M III 33
 Spur 10: A1 20 nach Exo III-Verdau
 Spur 11: M I 25 nach Exo III-Verdau
 Spur 12: M III 33 nach Exo III-Verdau



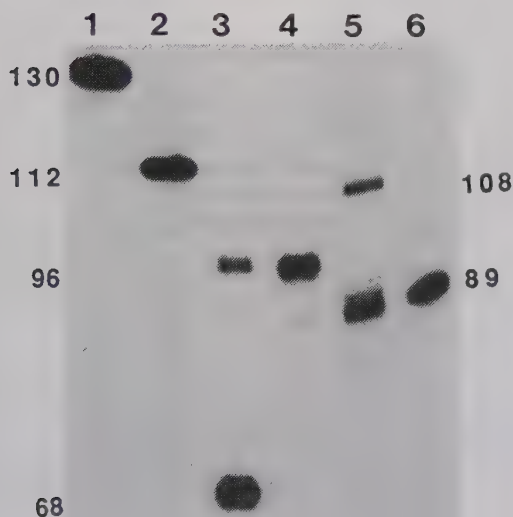
Die Analyse der mit Exonuklease III verdauten, an beiden Strängen 5'-markierten DNA im Sequenzgel erlaubt keine Zuordnung der Banden zum codogenen bzw. zum nicht-codogenen Strang. Schneiden mit Ava II entfernt die Markierung des codogenen Strangs am stromabwärts liegenden Ende, so daß ein Vergleich der Bandenmuster von Exonuklease III-verdauten Komplexen in identischen Rastern die a) mit dem an beiden 5'-Enden markierten 130 bp-A1-Fragment und b) mit dem Ava II-nachgeschnittenen 112 bp-A1-Fragment gebildet wurden, eine eindeutige Zuordnung erlaubt.

Abb. 14 zeigt die Protektionsmuster des binären Komplexes und eines ternären Komplexes im 11er-Raster. Beim Betrachten der Banden, die von dem mit Ava II-nachgeschnittenem A1-Fragment herrühren, wird deutlich, welche Banden vom nicht-codogenen DNA-Strang stammen. Dadurch ist die Zuordnung eindeutig. Bei ternären Komplexen entsprechen die oberen Banden dem nicht-codogenen DNA-Strang, die unteren dem codogenen. Beim binären Komplex ist es umgekehrt.

Abb. 14

Exonuklease III-Protektionsmuster des binären Komplexes und von A1 11. Vergleich der Muster der an beiden 5'-Enden markierten DNA-Fragmente mit den mit Ava II nachgeschnittenen A1-Fragmenten.

- Spur 1: 130 bp-A1-Fragment
 Spur 2: 112 bp-A1-Fragment, das stromabwärts liegende Ende wurde mit Ava II abgeschnitten
 Spur 3: Protektionsmuster von A1 11
 Spur 4: Protektionsmuster von A1 11, nachgeschnitten mit Ava II
 Spur 5: Protektionsmuster des binären Komplexes mit A1
 Spur 6: Protektionsmuster des binären Komplexes mit Ava II-geschnittenem A1



Mit Hilfe der unter III.3.2 beschriebenen fünf mutierten A1-Sequenzen zusätzlich zum Wildtyp war es möglich, ternäre Komplexe in folgenden Rastern zu erzeugen und sie einem Exonuklease III-Verdau zu unterwerfen: A1 11; M I 16; M II 20 (nicht Exo III-stabil, siehe Abb.11); M III 24 (teilweise nicht Exo III-stabil); M IV 27; M V 30; A1 20; M I 25; M II 29; M III 33; M IV 36; M V 39.

Abb. 15 zeigt das Protektionsmuster sämtlicher Komplexe, die nach Exo III-Verdau stabile Produkte enthielten. Wie vorher verifiziert wurde, entsprechen die jeweils oberen Banden dem nicht-codogenen Strang, die unteren dem codogenen.

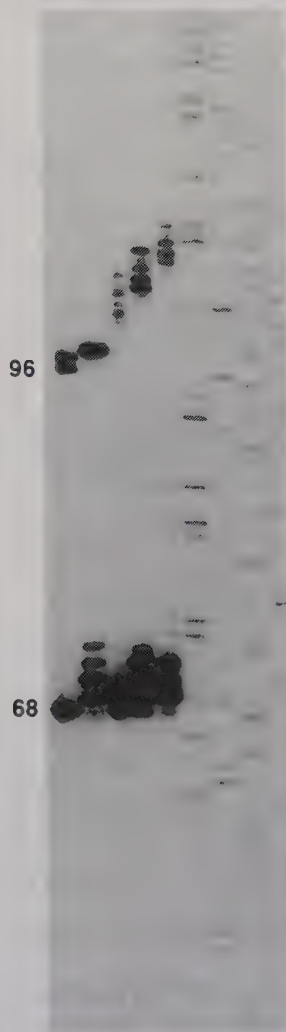
Abb. 15 (nächste Seite)

Exonuklease III-Protektionsmuster sämtlicher Exo III-stabiler Transkriptionsstadien

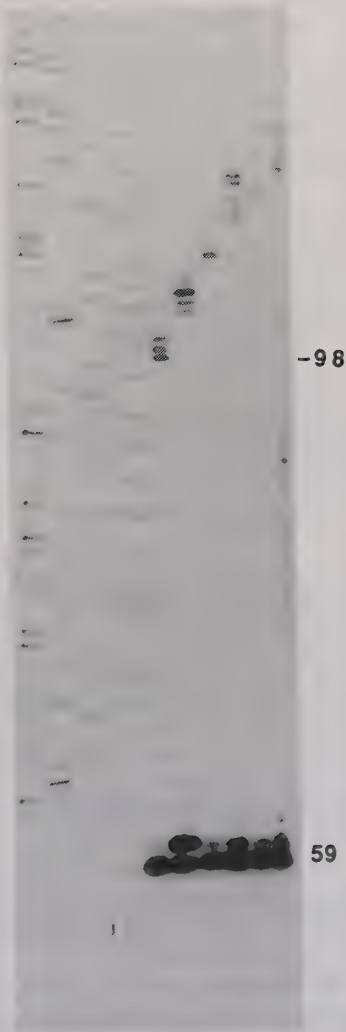
Ternäre Komplexe in den angegebenen Rastern wurden mit Exo III verdaut, die Proben zur Reinigung der verdauten Komplexe auf ein nicht-denaturierendes Acrylamidgel aufgetragen, und die Komplexbanden aus dem Gel ausgeschnitten. Nach Elution wurde die verdaute DNA auf einem 8%igen Sequenziergel analysiert.

- | | | |
|----|---------------|--|
| a) | Spur 1: | A1 11 |
| | Spur 2: | M I 16 |
| | Spur 3: | M III 24 |
| | Spur 4: | M IV 27 |
| | Spur 5: | M V 30 |
| | Spur 6 bis 9: | A, C, G, T Didesoxysequenzierreaktion von M13mp18 als Längenmarker |
| b) | Spur 1 bis 4: | A, C, G, T Sequenzierreaktion von M13mp18 |
| | Spur 5: | A1 20 |
| | Spur 6: | M I 25 |
| | Spur 7: | M II 29 |
| | Spur 8: | M III 33 |
| | Spur 9: | M IV 36 |
| | Spur 10: | M V 39 |

a
1 2 3 4 5 6 7 8 9



b
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



Die Übertragung des Protektionsmusters der geschützten DNA-Bereiche in eine Graphik ist in Abb. 16 zu sehen. Die Balken über den jeweiligen DNA-Strängen entsprechen der Länge der jeweils geschützten DNA, wie sie aus dem Gelbild ermittelt wurde. Die Zahl der minimal geschützten Nukleotide ist angegeben. Abb. 17 zeigt einen Detailausschnitt der geschützten DNA-Bereiche mit Angabe der jeweiligen Nukleotidsequenzen.

Die Längen der Exo III-verdauten DNA-Fragmente wurden durch Vergleich mit der nach der Didesoxymethode erhaltenen Sequenz des einzelsträngigen Phagen M13mp18 geeicht. Um etwaige Unterschiede im Laufverhalten der beiden Stränge aufgrund ihrer unterschiedlichen Basenzusammensetzung ausschließen zu können, wurde das an beiden 5'-Enden markierte 130 bp-A1-Fragment mit Fok I nachgeschnitten. Es entstanden ein 80 bp-Bruchstück, an dem der nicht-codogene Strang mit ^{32}P markiert war, und ein 50 bp-Bruchstück, an dem der codogene Strang markiert war. Die A1-Bruchstücke wurden dann mit der Sequenz von M13mp18 verglichen. Der maximale Fehler bei der Längenbestimmung der Gelbanden kann dadurch auf ± 1 Base abgeschätzt werden.

Abb. 16 (nächste Seiten)

Übersicht der vor Exo III-Verdau geschützten DNA-Bereiche in verschiedenen Transkriptionsstadien

Angegeben sind Transkriptlängen ($\longrightarrow$) und die von der RNA-Polymerase vor Exo III-Verdau minimal geschützten Bereiche (|||||). Die Banden im Sequenziergel (Abb. 15), die die Grenzen der Exo III-"footprints" markieren, sind auf dem jeweiligen DNA-Strang durch ||| angegeben. Die Zahlen bezeichnen entweder die Länge der Transkripte oder die minimal geschützten DNA-Bereiche. Abb. 16 a und b unterscheiden sich nur dadurch, daß, um die Übersicht zu verbessern, in

- a) die 5'-Enden der DNA-Fragmente und damit auch die 5'-Enden der Transkripte und in
- b) die 3'-Enden der DNA-Fragmente und damit, innerhalb der beiden Gruppen (A1 11 bis M V 30 bzw. A1 20 bis M V 39), auch die 3'-Enden der Transkripte auf gleicher Höhe gezeichnet sind.

Abb. 16 a

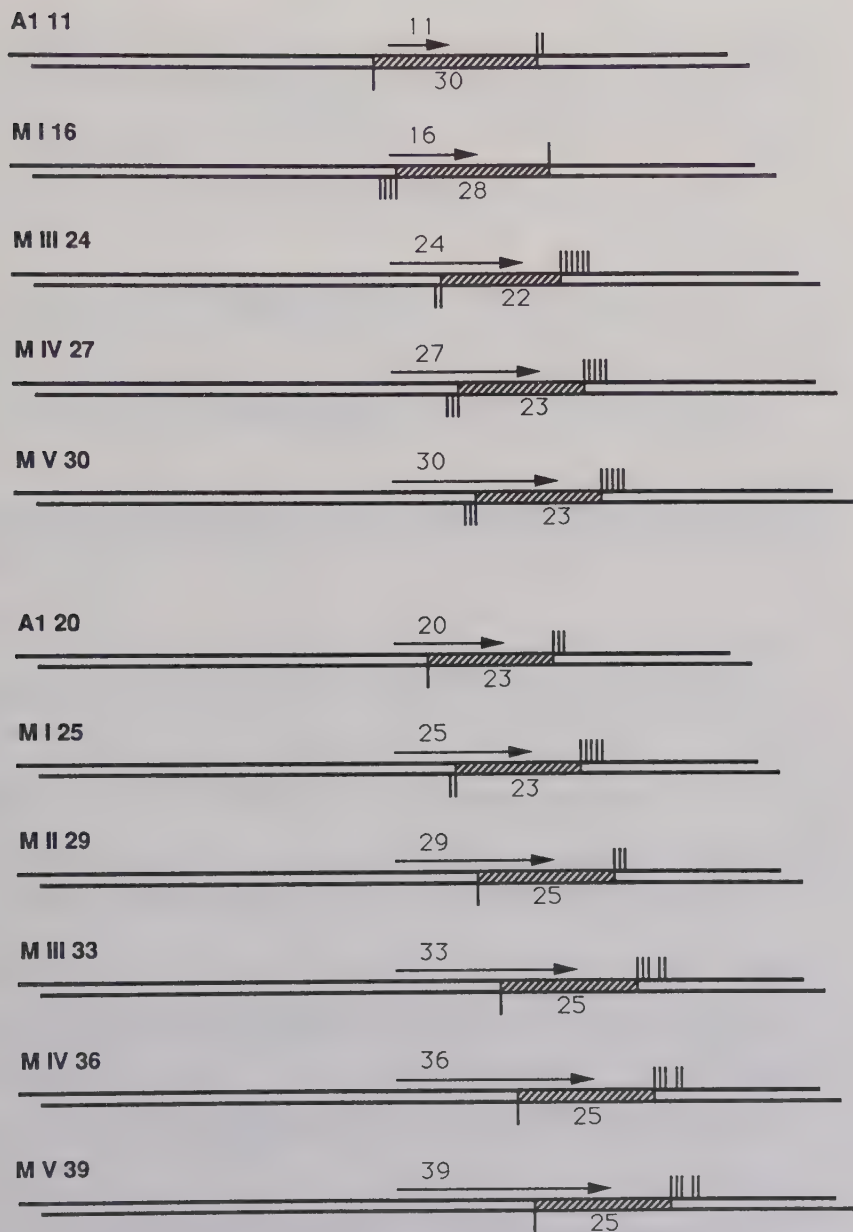


Abb. 16 b

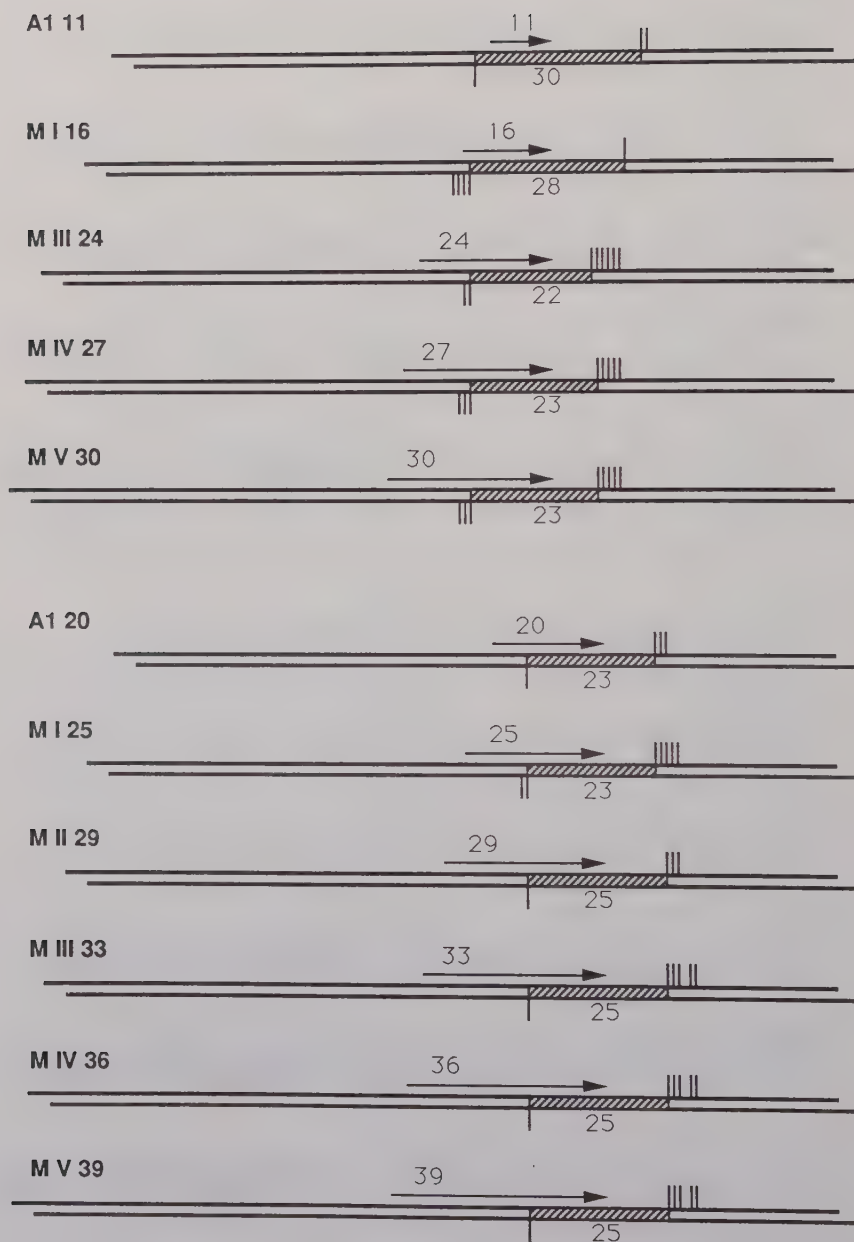


Abb. 17

Sequenzen der vor Exo III-Verdau geschützten DNA-Bereiche in verschiedenen Transkriptionsstadien (Die Sequenzen sind jeweils von -7 bis +57 angegeben). Die ||| geben die Grenzen der "footprints" auf den entsprechenden DNA-Strängen an. Der jeweils obere Strang ist der nicht-codogene.

A I 11

||

TACAGCCATCGAGAGGGACACGGCGAATAGCCATCCCAATCGACACCGGGGTCCGGGATCTGGA
ATGTCGGTAGCTCTCCCTGTGCCGCTTATCGGTAGGGTTAGCTGTGGCCCCAGGCOCTAGACCT

M I 16

|

TACAGCCATCGAGAGGGAagaggCACGGCGAATAGCCATCCCAATCGACACCGGGGTCCGGGAT
ATGTCGGTAGCTCTCCCTtctccGTGCCGCTTATCGGTAGGGTTAGCTGTGGCCCCAGGCOCTA

||||

M III 24

|||||

TACAGCCATCGAGAGGGAagagagagagaggCACGGCGAATAGCCATCCCAATCGACACCGGGG
ATGTCGGTAGCTCTCCCTtctctctctctccGTGCCGCTTATCGGTAGGGTTAGCTGTGGCCCC

||

M IV 27

|||||

TACAGCCATCGAGAGGGAagagaagagagagaggCACGGCGAATAGCCATCCCAATCGACACCG
ATGTCGGTAGCTCTCCCTtctcttctctctctccGTGCCGCTTATCGGTAGGGTTAGCTGTGGC

|||

M V 30

|||||

TACAGCCATCGAGAGGGAagagaagaagagagagaggCACGGCGAATAGCCATCCCAATCGACA
ATGTCGGTAGCTCTCCCTtctcttcttctctctctccGTGCCGCTTATCGGTAGGGTTAGCTGT

|||

A1 20

|||

TACAGCCATCGAGAGGGACACGGCGAATAGCCATCCCAATCGACACCGGGGTCCGGGATCTGGA
 ATGTCGGTAGCTCTCCCTGTGCTGCTTATCGGTAGGGTTAGCTGTGGCCCCAGGCCCTAGACCT

|

M I 25

||||

TACAGCCATCGAGAGGGAagagggCACGGCGAATAGCCATCCCAATCGACACCGGGGTCCGGGAT
 ATGTCGGTAGCTCTCCCTtctccGTGCCGCTTATCGGTAGGGTTAGCTGTGGCCCCAGGCCCTA

||

M II 29

||| ||

TACAGCCATCGAGAGGGAagagagagggCACGGCGAATAGCCATCCCAATCGACACCGGGGTCCG
 ATGTCGGTAGCTCTCCCTtctctctccGTGCCGCTTATCGGTAGGGTTAGCTGTGGCCCCAGGC

|

M III 33

||| ||

TACAGCCATCGAGAGGGAagagagagagagggCACGGCGAATAGCCATCCCAATCGACACCGGGG
 ATGTCGGTAGCTCTCCCTtctctctctctccGTGCCGCTTATCGGTAGGGTTAGCTGTGGCCCC

|

M IV 36

||| ||

TACAGCCATCGAGAGGGAagagaagagagagagggCACGGCGAATAGCCATCCCAATCGACACCG
 ATGTCGGTAGCTCTCCCTtctcttctctctctccGTGCCGCTTATCGGTAGGGTTAGCTGTGGC

|

M V 39

||| ||

TACAGCCATCGAGAGGGAagagaagaagagagagagggCACGGCGAATAGCCATCCCAATCGACA
 ATGTCGGTAGCTCTCCCTtctcttctctctctccGTGCCGCTTATCGGTAGGGTTAGCTGTG

|

Folgende Ergebnisse lassen sich aus Abb. 15, 16 und 17 ableiten:

- a) Der geschützte Bereich auf der DNA verkürzt sich deutlich vom A1 11 Raster zu den späteren Rastern wie A1 20 oder M III 24. Dabei wird klar, daß sich die stromaufwärts liegende Grenze der Polymerase ziemlich exakt um die Zahl der zusätzlich transkribierten Basen in Leserichtung verschiebt. Die Verkürzung des gegen Exo III-Verdau geschützten Bereichs vollzieht sich also ausschließlich an der stromabwärts liegenden Seite der RNAP.

- b) Die stromaufwärts liegende Grenze der RNA-Polymerase ist in fast allen Rastern, besonders in denen, die mit ApUpC, GTP, ATP, CTP erzeugt wurden, wesentlich schärfer (auf ein bis zwei Basen genau) als die stromabwärts liegende. Das trifft besonders für Transkriptionsstadien mit längeren Produkten zu.

- c) Die Grenzen der geschützten Bereiche sehen innerhalb einer Gruppe (ApUpC, GTP, ATP oder ApUpC, GTP, ATP, CTP) einheitlich aus. Das fällt besonders an den Bandenmustern, die die stromabwärts liegende Grenze der RNA-Polymerase markieren, auf. Zwischen den Gruppen existieren kleinere, wahrscheinlich sequenzbedingte, Unterschiede.

- d) Der gesamte, durch RNA-Polymerase geschützte Bereich bewegt sich (jeweils innerhalb der beiden Gruppen) bei Transkriptionsstadien mit längeren Produkten (> ca.25 Basen) um exakt die Zahl der zusätzlich transkribierten Nukleotide stromabwärts.

- e) Der Schwerpunkt des Bandenmusters, das die stromabwärts liegende Grenze der RNA-Polymerase markiert, verschiebt sich etwas zu längeren DNA-Fragmenten, vergleicht man z.B. das 20er-Stadium mit Transkriptionsrastern (in der ApUpC, GTP, ATP, CTP Gruppe), die Produkte enthalten, die länger als 30 Nukleotide sind. Das ist gleichbedeutend mit einer leichten Vergrößerung des Protektionsmusters am stromabwärts liegenden Ende der RNAP.

In Abb. 15 erkennt man, daß die Banden, die das stromaufwärts liegende Ende der RNAP markieren, stets stärker sind als die, die das stromabwärts liegende Ende abgrenzen. Diese Diskrepanz in der Intensität der Banden verstärkt sich noch mit zunehmender Länge der Produkte. Da beide Enden gleich sind (Bam H I-Restriktionsschnittstellen), ist eine unterschiedliche Markierungseffizienz unwahrscheinlich. Eine Erklärung für dieses Phänomen könnte sein, daß in sämtlichen verwendeten Chargen von Exonuklease III eine Nebenaktivität gefunden wurde, die die 5'-³²P-Markierung abtrennt. Nimmt man an, daß es sich um eine Endonukleaseaktivität handelt, würden die Chancen des Enzyms bei fortschreitender Translokation der RNA-Polymerase immer größer, den codogenen Strang zu schneiden und dessen Markierung zu entfernen. Diese Annahme wird bestätigt durch Analyse der Bandenstärken des binären Komplexes (siehe Abb. 14), dessen Intensitätsverhältnisse aufgrund seiner Geometrie genau umgekehrt sind.

Die Tatsache, daß sich längere DNA-Fragmente etwas schlechter aus den nicht-denaturierenden Gelen eluieren lassen als kurze, verstärkt wahrscheinlich zusätzlich die Intensitätsunterschiede der Banden im Sequenzgel.

III.4.4 Produktanalyse der Exonuklease III-verdauten Komplexe

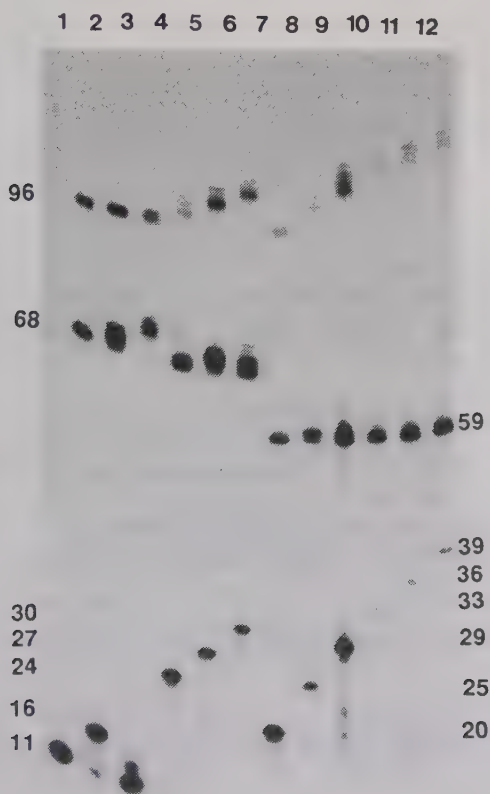
Alle Ergebnisse der Exo III-Protektionsexperimente haben nur dann Aussagekraft, wenn die unter III.3 aufgestellte Forderung nach der korrekten Transkriptlänge in den verschiedenen Rastern erfüllt ist. Deshalb wurde ein Aliquot der gleichen Proben, die auf dem Gel in Abb. 15 zu sehen sind, auf ein zweites Gel mit höherer Acrylamidkonzentration aufgetragen. In diesem Gel wurden vorwiegend die Produkte analysiert (Abb. 18). Das Ergebnis dieser Analyse beweist, daß tatsächlich alle ternären Komplexe die gewünschten Produkte enthielten, mit Ausnahme des nicht Exonuklease III-stabilen M II 20-Stadiums.

Abb. 18

Analyse der Produkte der Exonuklease III-verdauten Komplexe

Auf dem Gelbild sind, außer dem zusätzlich aufgetragenen M II 20-Stadium, die gleichen Proben zu sehen wie in Abb. 15a und b. Die Acrylamidkonzentration des Gels betrug 8%.

Spur 1: A1 11
 Spur 2: M I 16
 Spur 3: M II 20 (nicht stabil)
 Spur 4: M III 24
 Spur 5: M IV 27
 Spur 6: M V 30
 Spur 7: A1 20
 Spur 8: M I 25
 Spur 9: M II 29
 Spur 10: M III 33
 Spur 11: M IV 36
 Spur 12: M V 39



III.4.5. Vergleich der "footprints" eines Exo III-stabilen und eines Exonuklease III-labilen M III 24 -Stadiums

Ist ein Produkt gegenüber Exonuklease III nicht stabil, so drückt sich das auch im Exonuklease III-"footprint" aus (Abb. 19). Zwei Protektionsmuster des gleichen M III 24-Rasters sind nebeneinander aufgetragen. Einmal waren die Produkte stabil gegen Exonuklease III-Verdau, einmal wegen offenbar geringfügig veränderten Versuchsbedingungen nicht. Man erkennt, daß die Protektionsmuster eindeutig mit den Längen der an die ternären Komplexe gebundenen Produkte korreliert sind. Das Exo III-instabile Stadium, das als Produkt hauptsächlich 10er- und 11er-Nukleotide gebunden hatte (siehe Abb.11a), zeigte ein Protektionsmuster, das mit dem von A1 11 identisch war (Abb. 19b).

Abb. 19 (nächste Seite)

Vergleich der Protektionsmuster eines Transkriptionsstadiums, dessen Produkte sowohl stabil als auch labil gegenüber Exonuklease III waren

- a) Spur 1: Exo III-instabiles M III 24-Stadium
- Spur 2: Exo III-stabiles M III 24-Stadium
- Spur 3 bis 6: A, C, G, T Didesoxysequenzierreaktion von M13mp18
- b) Unterschiede der Protektionsmuster zwischen Exo III-stabilem und Exo III-labilem Stadium als Graphik



Abb. 19 b

M III 24 (Exo III instabil)



M III 24 (Exo III stabil)



IV Diskussion

IV.1. Charakterisierung intermediärer Transkriptionsstadien mit Hilfe von nicht-denaturierenden Acrylamidgelen

Die Methode, binäre und ternäre RNAP-DNA - Komplexe mit nicht-denaturierenden Acrylamidgelen zu untersuchen, ermöglichte es, gleichzeitig quantitative und qualitative Aussagen über RNAP-DNA - Komplexe zu machen. Sie ist damit anderen Methoden wie z.B. der Filterbindungsmethode (Strauss et al., 1980) überlegen. Die Vergleiche von radioaktiv markierten, EtBr- und Coomassie-Blue-gefärbten Komplexbanden, liefern ein, allerdings grobes, Mittel zur Abschätzung der durch die Polymerase bedeckten DNA-Bereiche. Es war möglich, die Zahl der pro DNA-Fragment gebundenen Enzymmoleküle zu bestimmen und darüberhinaus Unterschiede zwischen spezifisch promotorgebundenen Polymerasen und unspezifisch gebundenen Mehrfachbesetzungen anhand des Ausschlusses von EtBr zu erkennen.

Quantitative Aussagen aus gelelektrophoretischen Untersuchungen sind nur dann glaubwürdig, wenn die auf jede Spur aufgetragene Radioaktivität bei den Densitometriemessungen wiedergefunden werden kann. Diese Voraussetzung wurde innerhalb von 10% Fehler für die Experimente, in denen Coreenzym-DNA - Komplex mit σ -Faktor und in denen A1-Fragment mit steigenden Mengen Holoenzym titriert wurde, erfüllt.

Da Ladungseffekte als Grund für die auffällig verzögerte Laufeigenschaft des spezifischen Holoenzym-DNA - Komplexes im Vergleich zum Core-DNA - Komplex ausgeschlossen werden können, muß eine Konformationsänderung vorliegen. Eine von der RNA-Polymerase induzierte Biegung der DNA ist wahrscheinlich, da Ergebnisse von Wu und Crothers, (1984) zeigen, daß gekrümmte DNA-Moleküle gegenüber nicht gekrümmter DNA deutlich verzögerte Laufeigenschaften in Acrylamidgelen haben und jüngere Ergebnisse (Heumann, Ricchetti und Werel, eingereicht; Kuhnke et al., 1987) starke Hinweise für eine Biegung der DNA im spezifischen RNAP-Promotor - Komplex liefern. Als maximale

Abschätzung des Biegungswinkels haben Neutronenstreudaten von H. Lederer, (1987) eine 45°-Abweichung von der Geraden ergeben.

Der Komplex aus Holoenzym und A1-Promotor wird mit abnehmender Temperatur zunehmend instabiler. Dieser Vorgang wird von einer Dissoziation des σ -Faktors begleitet, so daß man die Destabilisierung des Komplexes nicht einfach mit einem Übergang von offenem in geschlossenen Komplex gleichsetzen kann, wie dies bei früheren Arbeiten vereinfachend gemacht wurde. Die Temperaturabhängigkeit von Komplexen aus RNA-Polymerase und A1-Promotor unterscheidet sich deutlich von der bei RNAP-*lac* UV 5 - Promotorkomplexen. Straney und Crothers, (1985) fanden für diesen Promotor zwei Arten von offenem Komplex mit deutlich unterschiedlichen Laufeigenschaften in nicht-denaturierenden Gelen. Der schneller laufende Komplex war bei niedrigeren Temperaturen (16° C), der langsamere bei höheren Temperaturen (37° C) dominant. Die beiden Komplexarten waren durch Temperaturänderung ineinander überführbar. Zwischen 50 und 16° C fanden Straney und Crothers eine labile Form des binären Komplexes, die möglicherweise dem geschlossenen Komplex entsprach (Hawley et al., 1982; Stefano und Gralla, 1980).

Die Tatsache, daß kurze Transkripte (zwei bzw. drei Nukleotide lang) nicht stabil an den RNAP-DNA - Komplex gebunden sind, steht im Einklang mit Resultaten von Straney und Crothers, (1985); Hansen und McClure, (1980); Carpousis und Gralla, (1980) und Grachev und Zaychikov, (1980). Diese besagen, daß Transkripte erst ab einer Länge von 8-10 Basen stabil an ternäre Komplexe gebunden bleiben; möglicherweise ist eine feste Bindung der RNA verbunden mit der Dissoziation des σ -Faktors und der Ausbildung eines DNA-RNA - Hybrids von definierter Mindestgröße. Nur an poly dA-T wurde bislang ein stabil gebundenes RNA-Trimer gefunden (Schulz und Zillig, 1981). Die Ergebnisse meiner Arbeit zeigen, daß ein 11 Nukleotide langes Transkript (siehe III.3) fest an den ternären Komplex gebunden ist, der σ -Faktor ist in diesem Stadium schon dissoziiert.

Ein Teil der "run-off"-Transkripte bleibt an den DNA-RNAP - Komplex gebunden. Die Inhomogenität der Transkripte wird möglicherweise durch spezielle topologische Verhältnisse am Ende des DNA-Fragments verursacht. Niemals konnten im Gel stabile RNA-Polymerase - RNA - Komplexe ohne DNA gefunden werden, wie sie von Straney und Crothers, (1985) und von Shi et al., (1988) beobachtet wurden.

IV.2. Erzeugung von Transkriptionsstadien mit RNA-Produkten definierter Länge

Um Aussagen über die Art der Fortbewegung der Polymerase auf der DNA machen zu können, ist ein "Einfrieren" der Transkription in definierten Rastern erforderlich. Kritisch ist dabei die Wahl der Triphosphatkonzentrationen. Bei meinen Versuchen war, nach Etablierung der Bedingungen, gewährleistet, daß die gewünschten Produkte einheitlich und damit die Komplexe in den korrekten Rastern waren.

Erstaunlich war, daß bei der Synthese von längeren RNA-Ketten stets weniger Radioaktivität in den Produktbanden wiederzufinden war als bei kürzeren. Es ist unwahrscheinlich, daß ein von Kammerer et al., (1986) beschriebener Effekt, der den Einfluß von stromabwärts vom Initiationspunkt der Transkription liegenden Sequenzen auf die Transkriptionsrate beschreibt, dafür verantwortlich ist, da die Ausbeute an ternärem Komplex nicht in der gleichen Weise abnimmt wie die der Produkte. Man würde eine gleichzeitige Abnahme der Produkte und der Komplexe erwarten wenn die Zahl der Komplexe, denen es gelingt vom Initiations- in den Elongationsmodus zu gelangen, kleiner würde. Möglicherweise liegt der Grund für die stärkere Abnahme der Produkte an der Tatsache, daß sie nahe ihrem 5'-Ende markiert sind (ApUp*C). Da die 5'-Enden von Transkripten, die länger als 12 bzw. 16 (Kumar und Krakow, 1975; Straney und Crothers, 1985) Nukleotide sind, für RNase A zugänglich werden, könnten schon kleinste RNase-Verunreinigungen im Transkriptionsansatz den Eindruck entstehen lassen, es wären sehr wenig längere Produkte gebildet worden.

IV.3. Einfluß von Exonuklease III auf ternäre Komplexe

Nicht bei allen ternären Komplexen bleiben die RNA-Produkte nach Exonuklease III-Verdau stabil. Im M II 20-Komplex wird die RNA immer, im M III 24-Komplex manchmal vom 3'-Ende her abgebaut; entsprechend änderten sich auch die Exonuklease III-Protektionsmuster. Die Gründe, warum gerade das M II 20-Raster instabil ist, sind unklar. Die nicht reproduzierbare Instabilität des M III 24-Rasters läßt jedoch vermuten, daß sowohl die Sequenz als auch die Versuchsbedingungen eine Rolle bei dieser Rückreaktion spielen, die dann durch ein "Nachfassen" der Exonuklease irreversibel gemacht wird. Der Einfluß der Sequenz auf die Translokation wird in einem Artikel von Yager und v.Hippel (1987), in dem sie eine energetische Betrachtung des Elongationsprozesses anstellen, diskutiert. Ihrer Ansicht nach ist es für die Geschwindigkeit der Vorwärtsreaktion bei jedem Elongationsschritt entscheidend, wie die Energiebilanz für diesen Schritt aussieht. Größen, die in diese Bilanz eingehen sind einmal der Verlust an freier Energie beim Aufschmelzen der DNA am Vorderende der einzelsträngigen DNA-"Blase" und beim Aufschmelzen des Hybrids zwischen codogenem DNA-Strang und naszierender RNA. Zum zweiten geht ein der Gewinn an freier Energie bei der Bindung des neu hinzukommenden Nukleotids und beim Schließen der DNA-"Blase" an ihrem stromaufwärts liegenden Ende. Das Aufschmelzen eines G-C - Paares in der DNA-"Blase" oder im DNA-RNA - Hybrid würde die Vorwärtsreaktion erschweren, die Bildung eines G-C -Paares sie begünstigen. Eine Betrachtung der Exo III-stabilen und -instabilen Stadien unter diesem Blickwinkel kann nicht exakt vorgenommen werden, weil nur jeweils die Art des neu hinzukommenden Ribonukleotids, nicht aber die genauen Grenzen der "Transkriptionsblase" oder das 5'-Ende des DNA-RNA - Hybrids bekannt sind. Allerdings ist es eher unwahrscheinlich, daß die von Yager und v.Hippel diskutierten Argumente der ausschließliche Grund für die Instabilität mancher Transkriptionsstadien sind. Vergleicht man nämlich das stabile Stadium A1 20 und das instabile M II 20, so erkennt man, daß an den Stellen in der Sequenz, an denen die "Transkriptionsblase"

(Shi et al., 1988; Gamper und Hearst, 1982) bzw. das DNA-RNA - Hybrid (Hanna und Meares, 1983) vermutet werden können, sehr große Sequenzhomologien bestehen (siehe Abb. 17).

Die Elongation ist eine reversible Reaktion, deren Richtung durch die Konzentration der an der Reaktion beteiligten Substanzen bestimmt wird. Das wird dadurch deutlich, daß bei Zugabe von Pyrophosphat zum Transkriptionsansatz in jedem Raster das Gleichgewicht zugunsten der Rückreaktion verschoben wird. Dieser Einfluß von Pyrophosphat auf die Richtung der Transkription wurde zuerst von Rozovskaya et al., (1981 und 1982) beobachtet. Betrachtet man die durch Pyrophosphat oder O-Methyl - NTPs geförderte und durch Exo III irreversibel gemachte Rückreaktion, fällt auf, daß niemals Produkte stabil an den ternären Komplex gebunden bleiben, die kürzer als zehn Basen sind. Möglicherweise sind zehn Nukleotide am A1-Promotor die Minimallänge für ein stabil gebundenes Produkt. Auch Grachev und Zaychikov, (1980) fanden an T7-DNA, daß die kürzesten stabil an die ternären Komplexe gebundenen Produkte zehn Nukleotide lang waren.

Kassavetis et al., (1986) berichten von einer Instabilität von Produkten, die mit Hilfe von O-Methyl - NTPs erzeugt wurden. Die von mir beobachtete hohe Instabilität der Produkte, die mit O-Methyl - NTPs gestoppt wurden, gegenüber Exo III, ist offenbar Ausdruck desselben Phänomens, obwohl nicht klar ist, warum speziell O-Methyl - NTPs die Rückreaktion begünstigen sollten. Unklar ist auch warum die Rückreaktion über die, wenn sie ohne O-Methyl - NTPs erzeugt wurden stabilen, im RNA-Produkt um je ein Nukleotid kürzeren Transkriptionsstadien hinwegläuft und erst wesentlich später zum Stehen kommt.

Über den Mechanismus der DNA-Exonuklease III - Wechselwirkungen ist sehr wenig bekannt. Dadurch kann der Zusammenhang zwischen Exo III-Wirkung und reduzierter Stabilität der Komplexe in einigen Stadien nur unvollständig diskutiert werden. Die Kenntnis der Lebensdauer des Exo III-DNA - Komplexes nach dem Auftreffen der Nuklease auf die RNA-Polymerase im Vergleich zur Geschwindigkeit der Rückreaktion wäre wichtig, denn eventuell spielt diese Geschwindigkeit für das "Nachfassen" der Exonuklease eine Rolle. Sie sollte schnell sein im Vergleich zur Verweildauer von Exonuklease III, denn falls Exo III

vor der Katalyse der Rückreaktion abdissoziiert, kann sie wahrscheinlich nicht mehr erneut binden. Unklar ist auch, welchen Einfluß das Exonuklease III-Molekül, das den codogenen Strang abbaut und von der stromaufwärts liegenden Seite auf die Polymerase trifft, auf die Rückreaktion hat. Man muß annehmen, daß die Rückreaktion beendet sein muß, bevor das von stromaufwärts kommende Exo III-Molekül, das im Vergleich zu dem von stromabwärts kommenden Molekül den längeren Weg hat, ein weiteres Zurücklaufen der RNAP verhindert.

IV.4. Exonuklease III-"footprinting"-Experimente

Für die Auswertung der Protektionsmuster von Transkriptionsstadien, deren Produkte sich jeweils nur um wenige Nukleotide in der Länge unterscheiden, muß zunächst gewährleistet sein, daß die Komplexe sich tatsächlich in den gewünschten Rastern befinden. Deshalb wurde der gleiche Versuchsansatz sowohl für die Analyse der Exonuklease III-Protektionsmuster als auch für die Analyse der RNA-Produkte verwendet (Abb 18).

Ein Vergleich der Exo III-Protektionsmuster verschiedener Stadien der Elongation (Abb. 15) zeigt, daß manche Grenzen der geschützten Bereiche auf ein oder zwei Basen genau bestimmt werden können, andere (wie die Vorgrenzen aller längeren Transkriptionsstadien) nur sehr ungenau definiert sind (± 3 Nukleotide) und ein "ausgefranstes" Bandenmuster im Gel zeigen. Die Frage ist, ob die unterschiedliche Schärfe der Protektionsgrenzen durch eine Sequenzspezifität der Exonuklease III hervorgerufen wird, oder ob die Uneinheitlichkeit der Grenzen eine Ungenauigkeit in der Positionierung der RNA-Polymerase widerspiegelt. Für letzteres spricht, daß die Exonuklease, wenn sie beim Verdau des nicht codogenen Stranges auf die Front der Polymerase trifft (zumindest innerhalb einer Transkriptionsgruppe mit ApUpC, GTP, ATP bzw. mit ApUpC, GTP, ATP, CTP), immer die gleiche DNA-Sequenz vorfindet (siehe Abb. 17). Deswegen sind eventuelle, sequenzbedingte Unterschiede des Protektionsmusters auszuschließen. Darüberhinaus sind die stromaufwärts liegenden Enden der RNA-Polymerase in allen

Stadien wesentlich schärfer als die in Transkriptionsrichtung liegenden, obwohl Exo III beim Verdau des codogenen Strangs und beim Auftreffen auf die Polymerase teilweise zwar sehr ähnliche, aber nicht vollkommen identische, Sequenzen vorfindet.

Aufgrund bereits bekannter Daten (Straney und Crothers, 1985 und 1987; Carpousis und Gralla, 1985; Spassky, 1986; Gamper und Hearst, 1982; Hanna und Meares, 1983; Siebenlist, 1980; Hansen und McClure, 1980; Chenchik et al., 1981) und der unter III.4.3. gefundenen Ergebnisse der Exo III-Protektionsversuche, läßt sich zwar noch kein eindeutig gültiges Modell für die Translokation der RNA-Polymerase während der Transkription aufstellen, es können jedoch einige Modellvorschläge so gut wie ausgeschlossen, andere favorisiert werden. Folgendes Bild ergibt sich:

Die RNA-Polymerase bedeckt im binären, offenen Komplex die DNA zwischen Pos. -46 ± 4 und ca. $+20$ (Die Verbrückungsdaten von Chenchik et al. liefern den einzigen Hinweis darauf, daß sich die RNAP sogar bis $+30$ erstreckt). Die DNA ist ca. von Pos. -9 bis $+3$ geschmolzen (Siebenlist, 1979), liegt also einzelsträngig vor. Während der ersten Schritte der Initiation oder der abortiven Transkription ändert sich das Bedeckungsmuster allenfalls etwas am stromaufwärts liegenden Ende (Straney und Crothers, 1987), oder es findet eine leichte Änderung der Kontakte innerhalb des geschützten Bereichs statt (Spassky, 1986). Nach Transkription einer für den jeweiligen Promotor typischen Zahl von Nukleotiden tritt eine drastische Änderung im Bedeckungsmuster der RNA-Polymerase ein. Sie verliert sämtliche Kontakte zur -35 - und zur -10 - Region und erstreckt sich z.B. beim *lac* UV 5-Promotor im 11er- und 16er-Raster von ca. -5 bis $+25$ (Straney und Crothers, 1985; Carpousis und Gralla, 1985) bzw. am A1-Promotor von -3 bis $+27$ oder $+28$ (eigene Ergebnisse, 11er-Raster). Die drastische Änderung des Protektionsmusters geht vermutlich mit der Dissoziation des σ -Faktors einher, nachdem die RNA auf acht bis neun Nukleotide angewachsen ist. Die einzelsträngige Region innerhalb des bedeckten Bereichs erstreckt sich über ca. 17 Nukleotide (Gamper und Hearst, 1982), und die naszierende RNA ist von ihrem 3'-Ende anfangend über ca. 12 Basen mit dem codogenen Strang hybridisiert (Hanna und Meares, 1983).

Der weitere Fortgang der Elongation ist nicht so einheitlich, wie bisher angenommen wurde. Meine Versuche zeigen, daß vom 11er- bis zu den frühen 20er-Stadien eine weitere Kontraktion der von der RNA-Polymerase bedeckten DNA-Region erfolgt. Während die DNA im 11er-Raster über eine Länge von ca. 30 bp geschützt war, umfaßt diese Region nur noch zwischen 22 und 25 Basenpaaren, wenn die RNA eine Länge von 20 Nukleotiden erreicht hat. Während sich das stromaufwärts liegende Ende der RNAP bei der Transkription vom 11er- ins 20er-Raster um exakt neun Nukleotide nach vorne verschiebt, bewegt sich die Front der Polymerase nur um ca. zwei Nukleotide. Von da ab verschiebt sich das Bedeckungsmuster kontinuierlich, offensichtlich bei der Verknüpfung jeder Diesterbindung genau um ein Nukleotid nach vorne. Wird das Transkript ca. 30 Nukleotide lang, vergrößert sich der von der RNA-Polymerase geschützte Bereich am stromabwärts liegenden Ende wieder um 2-3 Nukleotide, erreicht jedoch nicht mehr die Ausdehnung des 11er-Stadiums.

Aufgrund dieser Befunde wird ein Modell für die Translokation, wie es von Dennis und Sylvester, (1981) vorgeschlagen wurde, sehr unwahrscheinlich. Eine Rotation der Polymerase um eine Querachse während jedes Translokationsschrittes würde sicher nicht das sich synchron mit der RNA-Elongation nach vorne bewegendes Protektionsmuster ergeben. Auch das von mir lange Zeit als Arbeitshypothese favorisierte "Spannerraupe-Modell", das nur auf den Protektionsmustern der 11er- und 20er-Stadien fußte und das eine schubartige, wechselweise Translokation der Vorder- und Hinterenden der Polymerase um mehrere Basen postulierte, erwies sich letztlich als falsch.

Im großen und ganzen stehen die von mir gefundenen experimentellen Daten im Einklang mit dem schon in der Einleitung erwähnten Modell für die Translokation, wie es von Gamper und Hearst, (1982) vorgeschlagen wurde und wie es, leicht modifiziert und präzisiert, auch von Yager und von Hippel, (1987) favorisiert wird. Die auffälligste Diskrepanz zwischen diesem Modell und meinen experimentellen Daten besteht darin, daß es für die Änderung der "footprints" in der frühen Elongation keine Erklärung liefert, wie es übrigens auch die Änderung der geschützten DNA-Bereiche beim Übergang vom Initiationskomplex in den

Elongationskomplex nicht erklären kann. Dieser Übergang könnte kontinuierlicher sein, als bisher angenommen wurde. Straney und Crothers, (1987) fanden schon bei Initiationskomplexen eine "Aufweichung" des vor Exo III Verdau geschützten stromaufwärts liegenden DNA-Bereichs. Die Verkürzung des Protektionsmusters setzt sich nach meinen Daten auch in der frühen Elongation, nach dem Abdissoziieren des σ -Faktors, allerdings am stromabwärts liegenden Ende der RNA-Polymerase, fort.

Die Längsachsen der DNA und der RNA-Polymerase liegen im binären Komplex annähernd parallel, mit einem Abstand von ca. 5 nm (Heumann et al., 1988). Eine Änderung der Winkel der Längsachsen zueinander kann ohne dramatische Konformationsänderung des Enzyms erfolgen, die Verkürzung des Protektionsmusters zwischen Initiation und Elongation käme durch das Wegklappen des Hinterendes der RNA-Polymerase von der -35 und -10 - Region und gleichzeitigen Verlust des σ -Faktors zustande (siehe Abb. 20). Auch nach dem Beginn der Elongation könnte sich die Änderung des Winkels zwischen den Längsachsen von DNA und RNAP weiter fortsetzen, bis ab einem bestimmten Winkel mit relativ konstantem Protektionsmuster eine gleichmäßige Elongation, ähnlich dem von Gamper und Hearst (1982) vorgeschlagenen Modell der "Mutter auf einer Schraube", stattfände. Die früher schon erwähnte "Unschärfe" des in Transkriptionsrichtung liegenden Endes der RNA-Polymerase in längeren Transkriptionsstadien könnte von einer, eventuell thermisch bedingten Bewegung herrühren. Ein "Zittern" der Polymerase um eine senkrecht zur DNA-RNAP-Ebene (definiert durch die Längsachsen der RNAP und der DNA) stehende Achse ist vorstellbar. Diese Achse müßte durch einen Punkt nahe dem stromaufwärts liegenden Ende der "Transkriptionsblase" laufen. Für die beobachteten Unterschiede in den Protektionsmustern muß allerdings nicht unbedingt eine Kippbewegung des Enzyms verantwortlich sein, auch das Entstehen oder die Vergrößerung eines Knicks in der DNA könnte zu der beobachteten Abnahme des vor Exo III-Verdau geschützten DNA-Bereichs führen.

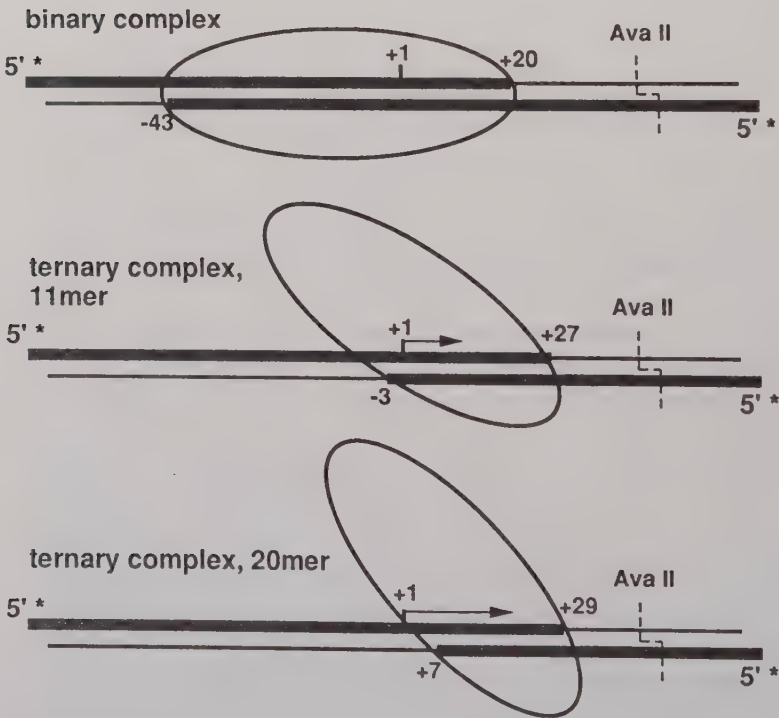
Weiter gänzlich offen bleibt der molekulare Mechanismus der Translokation. Die Frage ist, ob die Energie für die Translokation direkt über eine chemische Kopplung aus dem RNA-

Verlängerungsschritt zur Verfügung gestellt wird, oder ob die Voraussetzungen für die Translokation, d.h. das Aufschmelzen der DNA am Vorderende der "Transkriptionsblase" und das Aufschmelzen des DNA-RNA - Hybrids, durch thermische Energie geschaffen werden und der Translokationsschritt selbst, wie es Yager und v. Hippel, (1987) vorschlagen, letztlich durch eindimensionale Diffusion der RNA-Polymerase auf der DNA erfolgt. Nur die Richtung der Reaktion würde durch den RNA-Verlängerungsschritt bestimmt.

Abb. 20

Schema der Exonuklease III-Protektionsmuster

Die Anordnung der Polymerasemoleküle in den verschiedenen Transkriptionsstadien soll eine mögliche Erklärung für die Änderung der "footprints" vom binären Komplex über den ternären Komplex im 11er-Raster zum ternären Komplex im 20er-Raster geben.



V Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war es, einen Beitrag zum Verständnis des Mechanismus der Translokation der eubakteriellen RNA-Polymerase mit Hilfe von Exonuklease III-"footprinting"-Experimenten zu leisten. Für die Untersuchungen wurden ein 130 Basenpaare langes DNA-Fragment, das den starken Promotor A1 des Phagen T7 enthält und DNA-abhängige RNA-Polymerase aus *E. coli* verwendet.

Bei Arbeiten zur Etablierung der optimalen Bedingungen für diese Versuche wurden mit Hilfe der Gelretardierungsmethode (Fried und Crothers, 1981) folgende Ergebnisse erhalten:

1. Coreenzym-DNA - Komplexe sind nicht gegen Konkurrenz mit Heparin stabil. Sie gehen nach Zugabe von σ -Faktor in Holoenzym-DNA - Komplexe über; nur das spezifisch gebundene RNA-Polymerase - Molekül, eines pro A1-Promotorfragment, ist heparinstabil. Der Unterschied zwischen spezifischer Promotorbindung und unspezifischer Bindung wird auch durch den unterschiedlichen Ausschluß von EtBr deutlich.
2. Der spezifische Holoenzym-DNA - Komplex läuft im Acrylamidgel deutlich langsamer als aufgrund seines Molekulargewichts zu erwarten wäre. Deshalb wird eine Konformationsänderung gegenüber dem Coreenzym-DNA - Komplex postuliert, die evtl. auf eine induzierte Krümmung der DNA zurückzuführen ist.
3. Der spezifische RNAP-A1-Promotor - Komplex wird bei mittleren Ionenstärkebedingungen (50mM NaCl) durch sinkende Temperaturen destabilisiert. Dieser Vorgang geht mit einer zunehmenden Dissoziation des σ -Faktors einher.
4. Abortive Produkte bleiben nicht stabil an den Komplex gebunden. Das kürzeste fest mit dem ternären Komplex verbundene Transkript war elf Nukleotide lang. In diesem Stadium ist der σ -Faktor bereits abdissoziiert.
5. Durch Anbieten eines Startertrinukleotids und durch Weglassen von einem oder zwei Triphosphaten können spezifische Transkriptionsraster erzeugt werden; durch Mutieren der A1-Wildtypsequenz wurde die Zahl der Raster erweitert.

Transkriptionsstadien mit RNA-Kettenlängen von 11 bis 39 Nukleotiden wurden untersucht.

Für die Experimente, die Aufschluß über die Art der Translokation der RNA-Polymerase liefern sollten, wurden die verschiedenen Transkriptionsstadien mit Exonuklease III verdaut und die Protektionsmuster ausgewertet. Folgende Ergebnisse wurden erhalten:

6. Exonuklease III kann in manchen Transkriptionsstadien eine Rückreaktion der Transkription induzieren. Ähnliche Ergebnisse erhält man, wenn man Pyrophosphat zum ternären Komplex gibt. Die kürzesten, nach Rückreaktion noch stabil an den ternären Komplex gebundenen Produkte sind zehn Nukleotide lang.

7. Die Bedeckungsmuster der einzelnen Transkriptionsstadien ändern sich nach der Initiation wie folgt: Im 11er-Raster bedeckt die Polymerase 30 bis 31 Basen der DNA von -3 bis +27,28. Bis zum 20er-Raster wird der geschützte Bereich auf 23 bis 25 Basen kontrahiert, wobei hauptsächlich ein Verlust an Bedeckung am "Vorderende" der RNA-Polymerase auffällt. Dieses minimale Protektionsmuster bewegt sich synchron mit zunehmender Länge des Transkripts in Leserichtung nach vorne, wobei jedoch ab einer Transkriptlänge von ca. 30 Nukleotiden wieder eine Zunahme des geschützten Bereiches um zwei bis drei Basen, am "Vorderende" der Polymerase beobachtet wird. Die Vorgrenze des Protektionsmusters der RNAP ist, besonders bei Transkripten ab einer gewissen Länge, unschärfer als die hintere Begrenzung.

Die von mir gefundenen Daten zeigen, daß die Elongation nicht von Anfang an gleichmäßig verläuft, sondern die Bildung des "reifen" ternären Komplexes über mindestens zwei Übergangszustände läuft. Modelle für die Elongation, die eine Translokation mit größerer Periodizität als die Knüpfung der Diesterbindungen in der naszierenden RNA, postulieren, sind sehr unwahrscheinlich. Ein Modell, wie es von Gamper und Hearst, (1982) vorgeschlagen wurde, könnte die Translokation des "reifen" ternären Komplexes, der etwa ab dem 20-Nukleotid-Stadium fertig ausgebildet ist, korrekt beschreiben, obwohl es nur makroskopische und keine molekularen Vorstellungen beitragen kann. Für die Phase der

frühen Elongation wird eine Veränderung des Winkels zwischen DNA-Längsachse und der Längsachse der RNA-Polymerase, oder ein Knick in der DNA zur Erklärung der Verkürzung des Exonuklease III-"footprints" vorgeschlagen.

VI Literatur

Bernhard, S. L. & Meares, C. F. (1986) **The σ subunit of RNA polymerase contacts the leading ends of transcripts 9-13 bases long on the λ P_R promoter but not on T7 A1**, Biochemistry 25, 5914-5919

Birnboim, H.C. & Doly, J. (1979) **A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA**, Nucl. Acids Res., 7, 1513-1523

Buc, H. & McClure, W.R. (1985) **Kinetics of open complex formation between Escherichia coli RNA polymerase and the lac UV5 promoter. Evidence for the sequential mechanism involving three steps**, Biochemistry 24, 2712 - 2723

Burgess, R.R. & Travers, A.A. (1971) **Purification of the RNA polymerase sigma factor**, Methods Enzym. 21D, 500-506

Burton, Z., Burgess, R.R., Lin, J., Moore, D., Holder, S. & Carol, A.G. (1981) **The nucleotide sequence of the cloned rpoD gene for the RNA polymerase sigma subunit from E. coli K12**, Nucl. Acids Res. 9, no. 12, 2889-2903

Carpousis, A.J. & Gralla, J.D. (1980) **Cycling of ribonucleic acid polymerase to produce oligonucleotides during initiation in vitro at the lac UV 5 promoter**, Biochemistry 19, 3245-3253

Carpousis, A.J. & Gralla, J.D. (1985) **Interaction of RNA polymerase with lac UV 5 promoter DNA during mRNA initiation and transcription** Footprinting, methylation and Rifampicin-sensitivity changes accompanying transcription initiation, J. Mol. Biol. 183, 165-177

Chamberlin, M.J. (1974) **The selectivity of transcription**, Ann. Rev. Biochem. 43, 721-775

Chamberlin, M.J. (1976a) **RNA polymerase - an overview**, in RNA Polymerase, 17-67, Ed. M.J. Chamberlin & R. Losick, CSH Lab. Press, Cold Spring Harbor

Chamberlin, M.J. (1976b) **Interaction of RNA polymerase with the DNA template**, in RNA Polymerase, 159-191, Ed. M.J. Chamberlin & R. Losick, CSH Lab. Press, Cold Spring Harbor

Chenchick, A., Beabealashvilli, R. & Mirzabekow, A. (1981) **Topography of interaction of Escherichia coli RNA polymerase subunits with lac UV5 promoter**, Febs Letters - 128, 46-50

Dennis, D. & Sylvester, J.E. (1981) **RNA polymerase: A model for rotational translocation**, Febs Letters 124, no. 2, 135-139

Deuschle, U., Kammerer, W., Gentz, R. & Bujard, H. (1986) **Promoters of Escherichia coli: a hierarchy of in vivo strength indicates alternate structures** EMBO Journal 5, no. 11, 2987-2994

Dunn, J.J. & Studier, F.W. (1981) **Nucleotide sequence from the genetic left end of bacteriophage T7 to the beginning of gene 4**, J. Mol. Biol. 148, 303-330

Fried, M. G. & Crothers, D. M. (1981) **Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis**, Nucl. Acids Res. 9, 6505-6525

Gamper, H.B. & Hearst, J.E. (1982) **A topological model for transcription based on unwinding angle analysis of E. coli RNA polymerase binary, initiation and ternary complexes**, Cell 29, 81-90

Gamper, H.B. & Hearst, J.E. (1982) **Size of the unwound region of DNA in the Escherichia coli RNA polymerase and the calf thymus RNA polymerase II ternary complexes**, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 47, 455-461

Garner, M. & Revzin, A. (1981) **A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the Escherichia coli lactose operon regulatory system**, Nucl. Acids Res. 9, 3047-3060

Grachev, M.A. & Zaychikov, E.F. (1980) **Initiation by Escherichia coli RNA polymerase: transformation of abortive to productive complex**, Febs Letters 115, no. 1, 23-26

Grachev, M.A., Kolocheva, T.J., Lukhtanov, E.A. & Mustaev, A.A. (1987) **Studies on the functional topography of Escherichia coli RNA polymerase. Highly selective affinity labelling by analogues of initiating substrates**, Eur. J. Biochem. 163, 113-121

Gribskow, M. & Burgess, R.R. (1983) **Overexpression and purification of the sigma subunit of Escherichia coli RNA polymerase**, Gene 26, 109-118

Gunderson, S.I., Chapman, K.A. & Burgess R.R. (1987) **Interactions of T7 RNA polymerase with T7 late promoters measured by footprinting with Methidiumpropyl-EDTA-Iron(II)**, Biochemistry 26, 1539-1546

Hanna, M.M. & Meares, C.F. (1983) **Topography of transcription: path of the leading end of nascent RNA through the Escherichia coli transcription complex**, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 4238-4242

Hansen, U.M. & McClure, W.R. (1980a) **Role of the sigma subunit of Escherichia coli RNA polymerase initiation. I.**

Characterization of core enzyme open complexes, J. Biol. Chem. 255, 9556-9563

Hansen, U.M. & McClure, W.R. (1980b) **Role of the sigma subunit of Escherichia coli RNA polymerase initiation. II. Release of σ from ternary complexes**, J. Biol. Chem. 255, 9564-9570

Hawley, D.K., Malan, T.P., Mulligan, M.E. & McClure, W.R. (1982) **Intermediates on the pathway to open-complex formation in Promoters: Structure and function** (Rodriguez, R.B. & Chamberlin, M., eds.) 54-68 Praeger, New York

Heumann, H. (1978) **Untersuchungen über Transkription**, Dissertation, Universität München

Heumann, H., Lederer, H., Kammerer, W., Palm, P., Metzger, W. & Baer, G. (1987) **Large scale preparation of a DNA fragment containing the strong promoter A1 of the phage T7**, Biochim. Biophys. Acta, 909, 126-132

Heumann, H., Metzger, W. & Niehörster, M. (1986) **Visualization of intermediary transcription states in the complex between E. coli DNA-dependent RNA polymerase and a promoter-carrying DNA fragment using the gel retardation method**, Eur. J. Biochem. 158, 575-579

Heumann, H., Lederer, H., Baer, G., May, R.P., Kjems, J.K. & Crespi, H.L. (1988) **Spatial arrangement of DNA-dependent RNA polymerase of Escherichia coli and DNA in the specific complex; a neutron small angle scattering study**, J. Mol. Biol. 201, 115-125

Heumann, H., Ricchetti, M. & Werel, W. **DNA-dependent RNA polymerase of E. coli induces bending of DNA by specific complex formation**, eingereicht bei EMBO J.

Hillen, W., Klein, R.D. & Wells, R.D. (1981) **Preparation of milligram amounts of 21 deoxyribonucleic acid restriction fragments**, *Biochemistry* 20, 3748-3756

Hinkle, D. & Chamberlin, M. (1972) **Studies of the binding of Escherichia coli RNA polymerase to DNA**, *J. Mol. Biol.* 70, 157-185

Ikeda, R. A. & Richardson, C. C. (1986) **Interactions of the RNA polymerase of bacteriophage T7 with its promoter during binding and initiation of transcription**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 3614-3618

Kadesch, T.R., Rosenberg, S. & Chamberlin, M.J. (1982) **Binding of Escherichia coli RNA polymerase holoenzyme to bacteriophage T7 DNA; Measurements of binding at bacteriophage T7 promoter A1 using a template competition assay**, *J. Mol. Biol.* 155, 1-29

Kammerer, W., Deuschle, U., Gentz, R. & Bujard, H. (1986) **Functional dissection of Escherichia coli promoters: information in the transcribed region is involved in late steps of the overall process**, *EMBO Journal* 5, 2995-3000

Kassavetis, G.A. & Chamberlin, M. J. (1981) **Pausing and termination of transcription within the early region of bacteriophage T7 DNA in vitro**, *J. Biol. Chem.* 256, 2777-2786

Kassavetis, G.A., Zentner, P.G. & Geiduschek, E.P. (1986) **Transcription at bacteriophage T4 variant late promoters**, *J. Biol. Chem.* 261, 14256-14265

Kirkegaard, K., Buc, H., Spassky, A. & Wang, J.C. (1983) **Mapping of single stranded regions in duplex DNA at the sequence level: single strand specific cytosine methylation in RNA polymerase-promoter complexes**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 2544-2548

Krakow, J.S. & von der Helm, K. (1971) **Azetobacter RNA polymerase transitions and the release of sigma**, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 35, 73-83

Kuhnke, G., Fritz, H.J. & Ehring, R. (1987) **Unusual properties of promoter-up mutations in the Escherichia coli galactose operon and evidence suggesting RNA polymerase-induced DNA bending**, EMBO Journal 6, no. 2, 507-513

Kumar, S.A. & Krakow, J.S. (1975) **Studies on the product binding site of the Azetobacter vinelandii ribonucleic acid polymerase**, J. Biol. Chem. 250, 1556-1562

Laemmli, U.K. (1970) **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4**, Nature 226, 680-685

Lederer, H. (1987) **Untersuchungen der Quartärstruktur des RNA-Polymerase-Promotor-Komplexes und seiner Komponenten mit Neutronen-Kleinwinkelstreuung**, Dissertation, Technische Universität München

Levin, J.R. & Chamberlin, M.J. (1987) **Mapping and characterization of transcriptional pause sites in the early genetic region of bacteriophage-T7**, J.Mol. Biol. 196, no. 1, 61-84

Levin, J.R., Krummel, B. & Chamberlin, M.J. (1987) **Isolation and properties of transcribing ternary complexes of Escherichia coli RNA polymerase positioned at a single template base**, J. Mol. Biol. 196, no. 1, 85-100

Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. (1982) in **Molecular cloning. A laboratory manual**, CSH Lab. Press, Cold Spring Harbor

- McClure, W.R., Cech, C.L. & Johnston D.E. (1978) **A steady state assay for the RNA polymerase initiation reaction**, J. Biol. Chem. 253, no. 25, 8941-8948
- McClure, W.R. & Cech, C.L. (1978) **On the mechanism of Rifampicin inhibition of RNA synthesis**, J. Biol. Chem. 253, no. 25, 8949-8956
- Minkley, E.G. & Pribnow, D. (1973) **Transcription of the early region of bacteriophage T7: Selective initiation with dinucleotides**, J. Mol. Biol. 77, 255-277
- Morgan, W.D., Bear, D.G. & v.Hippel, P.H. (1984) **Specificity of release by Escherichia coli transcription termination factor rho of nascent mRNA transcripts initiated at the λ P_R promoter**, J. Biol. Chem. 259, 8664-8671
- Reznikoff, W.S., Siegele, D.A., Cowing, D.W. & Gross, C.A. (1985) **The regulation of transcription initiation in bacteria**, Ann. Rev. Genet. 19, 355-387
- Ricchetti, M., Metzger, W. & Heumann, H. (1988) **One-dimensional diffusion of Escherichia coli DNA-dependent RNA polymerase: A mechanism to facilitate promoter location**, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 4610-4614
- Roe, J-H., Burgess, R.R. and Record, M.T. (1985) **Temperature dependence of the rate constants of the Escherichia coli RNA polymerase - λ P_R promoter interaction. Assignment of the kinetic steps corresponding to protein conformational change and DNA opening**, J. Mol. Biol. 184, 441
- Rogers, S.G. & Weiss, B. (1980) **Exonuclease III of Escherichia coli K-12, an AP endonuclease**, Methods Enzym., 65, 201-211

Rohrer, H. & Zillig, W. (1977) **Studies on the transcription complex of *E. coli* RNA polymerase**, Eur. J. Biochem. 79, 401-409

Rosenberg, S., Kadesch, T.R. & Chamberlin, M.J. (1982) **Binding of *Escherichia coli* RNA polymerase holoenzyme to bacteriophage T7 DNA**, J. Mol. Biol. 155, 31-51

Rozovskaya, T.A., Chenchik, A.A. & Bibilashvili, R.S. (1981) **Pyrophosphorolytic reaction catalyzed by *Escherichia coli* RNA polymerase**, Molek. Biolog. 15, 498-510 (English transl.)

Rozovskaya, T.A., Chenchik, A.A. & Beabealashvili, R.S. (1982) **Processive pyrophosphorolysis of RNA by *Escherichia coli* RNA polymerase**, Febs Letters 137, no. 1, 100-104

Rozovskaya, T.A., Chenchik, A.A., Tarusova, N.B., Bibilashvili, R.S. & Khomutov, R.M. (1982) **Inorganic pyrophosphate analogs in the pyrophosphorolysis reaction catalyzed by *Escherichia coli* RNA polymerase**, Molek. Biolog. 15, 931-944 (English transl.)

Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, R. (1977) **DNA sequencing with chain-terminating inhibitors**, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, no. 12, 5463-5467

Schäfer, R., Zillig, W. & Zechel, K. (1973) **A model for the initiation of transcription by DNA-dependent RNA polymerase from *Escherichia coli***, Eur. J. Biochem. 33, 207-214

Schmitz, A. & Galas, J.D. (1979) **The interaction of RNA polymerase and lac repressor with the lac control region**, Nucl. Acids Res. 6, 111-137

Schulz, W. & Zillig, W. (1981) **Rifampicin inhibition of RNA synthesis by destabilization of DNA-RNA polymerase-oligonucleotide complexes**, Nucl. Acids Res. 9, 6889-6906

Shalloway, D., Kleinberger, T. & Livingston, D.M. (1980) **Mapping of SV 40 DNA replication origin region binding sites for the SV 40 DNA replication antigen by protection against Exonuclease III digestion**, Cell, 20, 411-422

Shi, Y. B., Gamper, H., Van Houten, B. & Hearst, J. E. (1988) **Interaction of Escherichia coli RNA polymerase with DNA in an elongation complex arrested at a specific psoralen crosslink site**, J. Mol. Biol. 199, 277-293

Siebenlist, U. (1979) **RNA polymerase unwinds an 11-base pair segment of a phage T7 promoter**, Nature 279, 651-652

Siebenlist, U., Simpson, R.B. & Gilbert, W. (1980) **E. coli RNA polymerase interacts homologously with two different promoters**, Cell 20, 269-281

Siebenlist, U. & Gilbert, W. (1980) **Contacts between Escherichia coli RNA polymerase and an early promoter of phage T7**, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 122-126

Sippel, A. & Hartmann, G. (1968) **Mode of action of Rifampicin on the RNA polymerase reaction**, Biochim. Biophys. Acta 157, 218-219

Spassky, A., Kierkegaard, K. & Buc, H. (1985) **Changes in the DNA structure of the lac UV5 promoter during the formation of an open complex with E. coli RNA-polymerase**, Biochemistry 24, 2723-2731

Spassky, A. (1986) **Visualization of the movement of the Escherichia coli RNA polymerase along the lac UV5 promoter during the initiation of transcription**, J. Mol. Biol. 188, 99-103

Stanssens, P., McKeown, Y., Friedrich, K. & Fritz, H.-J., in Vorbereitung

Stefano, J.E. & Gralla, J.D. (1980) **Kinetic investigation of the mechanism of RNA polymerase binding to mutant lac promoters**, J. Biol. Chem. 255, no. 21, 10423-10430

Straney, D.C. & Crothers, D.M. (1985) **Intermediates in transcription initiation from E. coli lac UV5 promoter**, Cell 43, 449-459

Straney, D. C. & Crothers, D. M. (1987) **A stressed intermediate in the formation of stably initiated RNA chains at the Escherichia coli lac UV 5 promoter**, J. Mol. Biol. 193, 267-278

Straney, D. C. & Crothers, D. M. (1987) **Comparison of the open complexes formed by RNA polymerase at the Escherichia coli lac UV 5 promoter**, J. Mol. Biol. 193, 279-292

Strauss, H.S., Burgess, R.R. & Record, T.M. Jr. (1980) **Binding of Escherichia coli ribonucleic acid polymerase holoenzyme to a bacteriophage T7 promoter-containing fragment: Selectivity exists over a wide range of solution conditions**, Biochemistry 19, 3496-3504

Stueber, D. & Bujard, H. (1982) **Transcription from efficient promoters can interfere with plasmid replication and diminish expression of plasmid specified genes**, EMBO Journal 1, no. 11, 1399-1404

Tullius, T.D. & Dombroski, B.A. (1986) **Hydroxyl radical "footprinting": High resolution information about DNA-protein contacts and application to λ repressor and cro protein**, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 5469-5473

von Hippel, P.H., Bear, D.G., Winter, R.B. & Berg, O. G. (1982) **Molecular aspects of promoter function: An overview** in Promoters Structure and Function, (Rodriguez, R.L. & Chamberlin, M.J. eds.) 3-31 Praeger, New York

von Hippel, P.H., Bear, D.G., Morgan, W.D. & McSwiggen, J.A. (1984) **Protein nucleic acid interactions in transcription: a molecular analysis**, Ann. Rev. Biochem. 53, 389-446

Walter, G., Zillig, W., Palm, P. & Fuchs, E. (1967) **Initiation of DNA-dependent RNA synthesis and the effect of heparin on RNA polymerase**, Eur. J. Biochem. 3, 194-201

Winter, R.B., Berg, O.G. & von Hippel, P.H. (1981) **Diffusion driven mechanisms of protein translocation on nucleic acids. 3. The Escherichia coli lac repressor-operator interaction: kinetic measurements and conclusions**, Biochemistry, 20, 6961-6977

Wu, H.M. & Crothers, D.M. (1984) **The locus of sequence directed and protein induced DNA bending**, Nature 308, 509-513

Yager, T.D. & von Hippel, P.H. (1987) **Transcript elongation and termination** in Escherichia coli and Salmonella typhimurium, 1241-1275, Ed. Neidhardt, F.C., Ingraham, J.L., Brooks Low, K., Magasanik, B., Schaechter M. & Umberger, H.E.

Zillig, W., Zechel, K. & Halbwachs, H.J. (1970a) **A new method of large scale preparation of highly purified DNA-dependent RNA polymerase from E. coli**, Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 351, 221-224

Zillig, W., Zechel, K., Rabussay, D., Schachner, M., Sethi, V.S., Palm, P., Heil, A. & Seifert, W. (1970b) **On the role of different subunits of DNA-dependent RNA polymerase from E. coli in the transcription process**, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 35, 47-58

Zillig, W., Palm, P. & Heil, A. (1976) **Function and reassembly of subunits of DNA-dependent RNA polymerase**, in RNA Polymerase, 101-125, Ed. M.J. Chamberlin & R. Losick, CSH Lab. Press, Cold Spring Harbor

Lebenslauf

Geburtsdatum: 15. 8. 1954

Geburtsort: München

Schulen:

Volksschule in Haar 1960-1964

Gymnasium in Grafing 1964-1973

Abitur 1973

Wehrdienst 1973-1975

Studium der Biologie an der
Ludwig-Maximilians-Universität
in München 1975-1978

Auslandsaufenthalt am University
College of Swansea, Wales 1978-1979

Weiterführung des Biologiestudiums
in München 1979-1984

Diplom 1984

Doktorarbeit unter der Anleitung von
Dr. H. Heumann am Max-Planck-Institut
für Biochemie Juni 1984-August 1988

verheiratet seit Januar 1988 mit Eva Rager
zwei Kinder, Michael und Thomas

